

**DETERMINAZIONE DEL POLIMORFISMO Q80K MEDIANTE RT-PCR E NEXT GENERATION SEQUENCING NEI PAZIENTI CANDIDATI A TERAPIA CON SIMEPREVIR**

S. Galli<sup>1</sup>, D. Dalmonte<sup>1</sup>, A. Barbieri<sup>1</sup>, M.V. Tamburini<sup>1</sup>, M. Compri<sup>1</sup>, A. Denicolò<sup>1</sup>, M.G. Meliconi<sup>1</sup>, G. Furlini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Microbiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico S.Orsola-Malpighi, via Massarenti 9, 40138 Bologna

**INTRODUZIONE**

L'infezione da virus dell'epatite C rappresenta, ancora oggi, la causa o concausa più frequente di malattia cronica del fegato, di cirrosi e di epatocarcinoma in tutto il mondo occidentale.

Negli ultimi anni, tuttavia, la terapia specifica ha subito un'evoluzione estremamente significativa. In particolare, agenti antivirali ad azione diretta (DAA) sono stati sviluppati migliorando drasticamente i tassi di azzeramento viremico rispetto alla terapia standard.

Una classe di farmaci particolarmente promettente, a cui appartiene il Simeprevir, ha come bersaglio la serin-proteasi codificata nell'area genomica denominata NS3/4.

A causa della elevata velocità di replicazione e la scarsa precisione della RNA polimerasi RNA-dipendente di HCV, nuove varianti emergono continuamente. Con l'esposizione ai DAAs, queste varianti resistenti hanno un vantaggio selettivo sul virus selvaggio originario ed emergono come ceppi dominanti della quasispecie.

L'efficacia di Simeprevir è sostanzialmente ridotta nei pazienti infetti dal virus dell'epatite C di genotipo 1a con il polimorfismo NS3 Q80K rispetto ai pazienti con epatite C di genotipo 1a wild type. È quindi fortemente raccomandato il test per la ricerca di tale polimorfismo nei pazienti con HCV quando si voglia impostare una terapia con Simeprevir.

**METODI**

Nel periodo compreso tra aprile e luglio 2015 sono stati analizzati i campioni di plasma di 126 pazienti con infezione da HCV genotipo 1a, candidati alla terapia con Simeprevir. L'estrazione dell'HCV-RNA è stata effettuata con ROBOT EZ1 (Qiagen) e l'estratto è stato processato, in modo completamente automatizzato, sul sistema Versant kPCR (Siemens Diagnostics) utilizzando il Kit Q80K Polymorphism (Clonit srl), per la discriminazione allelica del polimorfismo Q80K.

I campioni non amplificati sono stati successivamente testati, a scopo sperimentale, per la ricerca di tale polimorfismo mediante sequenziamento NGS (Next Generation Sequencing) utilizzando lo strumento GS Junior 454 (Roche).

**RISULTATI**

Dei 126 campioni testati mediante RT-PCR, l'analisi del polimorfismo ha permesso di individuare 84 HCV wild type (66.6%) e 28 campioni con polimorfismo Q80K(22.2%).

Quattordici campioni non hanno prodotto un amplificato rilevabile e sono quindi stati rivalutati tramite sequenziamento NGS. Di questi 3 presentavano un genotipo diverso dall'1a; uno presentava una viremia inferiore al limite di rilevazione dello strumento; 4 sono attualmente in corso di valutazione. Tra i restanti 6 campioni sequenziati solo uno ha mostrato il polimorfismo allelico, mentre gli altri sono risultati wild type.

**CONCLUSIONI**

Nella nostra casistica la presenza del polimorfismo Q80K è del 23% (29 campioni su 126 testati), mostrando una prevalenza non trascurabile, che giustifica la necessità di una sua valutazione nei pazienti candidati alla terapia con Simeprevir per predirne l'efficacia. Viste le ottime performance ottenute con entrambi i metodi utilizzati, lo studio potrebbe suggerire un modello di algoritmo diagnostico che preveda in prima istanza l'esecuzione di una PCR Real Time, metodica di rapida esecuzione e totalmente automatizzata, riservando il sequenziamento, che si è rivelato essere più sensibile, a casi selezionati.