P225

VIROLOGIA

GEN-C REAL TIME PER LA DEFINIZIONE DEL GENOTIPO DI HCV: ANALISI PRELIMINARE COMPARATIVA CON VERSANT HCV 2.0

M. Vatteroni [1], S. Frateschi [1], F. Meiners [1], M. Pistello [1]
[1] *U.O. Virologia Universitaria, AOUPisana, Pisa*

INTRODUZIONE

Malgrado il significativo sviluppo della terapia anti-HCV a seguito dell'introduzione dei DAA e culminata con la messa a punto di approcci terapeutici sempre più pan-genotipici, resta ancora alto l'interesse per una rapida e corretta definizione del genotipo di HCV. In alcune categorie di pazienti o in particolari condizioni cliniche, può essere ancora indicata la prescrizione di farmaci DAA genotipo-guidata, mentre è ovviamente indiscutibile l'importanza della genotipizzazione a scopo epidemiologico, per tracciare l'evoluzione del virus, individuare nuovi genotipi e monitorare la comparsa di fenomeni di ricombinazione.
In questo studio abbiamo valutato il kit GEN-C Real Time, in sviluppo da parte della Nuclear Laser Medicine, comparando i risultati con il test di ibridazione su striscia (InnoLiPA- Siemens).

METODI

Sono stati presi in esame 137 campioni di pazienti anti-HCV positivi afferenti alla U.O. con carica virale compresa tra 3,1 a 7,2 log10/ml determinata su piattaforma COBAS 6800 Roche Diagnostics. Il genotipo è stato determinato con kit Versant HCV 2.0 (RT-PCR one-step con primers in grado di amplificare 5'UTR e core seguita da ibridazione inversa su striscia) previa estrazione del RNA virale su piattaforma QIAsymphony con kit QIAsymph DSP Virus/Pathogen kit (Qiagen). L'estratto residuo è stato conservato a -20°C fino al momento dell'analisi con kit GEN-C che identifica i genotipi 1 - 6 e sottotipizza 1a e 1b basandosi su una real-time RT-PCR eseguita sulle regioni 5'UTR, core e NS5B, su strumentazione CFX BioRad a 5 canali. Ciascun campione è stato retrotrascritto e amplificato con tre diverse Mix contenenti primers e sonde specifiche, comprese quelle per la rilevazione del controllo interno (mRNA del gene GAPDH). Come nel kit Versant HCV 2.0, il controllo del carry over è stato attuato con UNG e dUTPs. La gestione dei risultati e l'interpretazione della seduta analitica è stata ottenuta con un software dedicato.

RISULTATI

Il saggio InnoLiPA dei 137 campioni ha dato i seguenti risultati: 20 HCV 1a, 27 HCV 1b, 9 HCV 2, 7 HCV 2a/2c, 2 HCV 2b, 2 HCV 3, 41 HCV 3a, 9 HCV 4, 14 HCV 4a/c/d e 6 non tipizzabili.
Il kit GEN-C ha caratterizzato il genotipo di tutti i 137 campioni e nel 96,9% dei casi il risultato è stato concordante.
Tra i campioni discordanti, 1 campione genotipo 2a/c è risultato 2+1b e l'analisi di sequenza ha confermato il dato ottenuto in Real Time dimostrando trattavasi di un ricombinante 2/1b.
Sono in corso analisi di sequenza per gli altri campioni discordanti: 2 campioni genotipo 1b e 1 campione genotipo 1a caratterizzati in Real Time come 1 o 6c-v.

CONCLUSIONI

La valutazione preliminare propende per un sistema real time rapido e affidabile, con l'interessante possibilità di individuare genotipi ricombinanti o coinfezioni.