P241

VIROLOGIA

NEXT GENERATION SEQUENCING: DETERMINAZIONE DI HCV GENOTIPO E RASS

C. Perini [2], S. Tiozzo [1], A. Ramuscello [2], N. Laganà [2], M. Favarato [2]
[1]*Università degli Studi di Padova*
[2]*UOC Laboratorio Analisi, AULSS 3 Serenissima, Venezia*

INTRODUZIONE

Secondo una stima dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), 71 milioni di persone nel mondo sono infette dal virus dell'epatite C (HCV). L'obiettivo dell'OMS è quello di eradicare il virus entro il 2030 riducendo il numero di nuove infezioni e contando sugli ottimi risultati terapeutici ottenuti con i farmaci "pangenotipici". Il tasso di guarigione, tuttavia, non raggiunge ancora il 100% a causa dell'alta variabilità genetica del virus e alla presenza di mutazioni puntiformi chiamate RASs (Resistance Associated Substitutions) che in alcuni casi possono portare all'inibizione dell'azione del farmaco sulla proteina virale target. La letteratura riporta esempi di pazienti naïve, andati incontro a fallimento terapeutico, che presentavano mutazioni a bassa frequenza (<10%) rilevate soltanto a posteriori. Altre cause di fallimento terapeutico sono riconducibili alla presenza di genotipi ricombinanti o di co-infezioni, spesso non facilmente determinabili con i metodi di genotipizzazione più classici.
In questo studio sono stati testati mediante Next Generation Sequencing (NGS) 20 campioni a carica virale e genotipo noti. La tecnologia NGS permette l'analisi mirata delle regioni virali di interesse clinico ed il rilevamento delle RASs.

METODI

Sono stati selezionati per lo studio 20 campioni HCV positivi, precedentemente genotipizzati con il kit Abbott RealTime HCV Genotype II (Abbott Park, Illinois, U.S.A.). Il sequenziamento è stato eseguito su piattaforma MiSeq-DX (Illumina) utilizzando il kit V-Seq HCV (AB ANALITICA) che prevede la genotipizzazione e l'identificazione di mutazioni legate alla farmacoresistenza per i genotipi 1a e 1b. Il kit V-Seq HCV permette l'analisi delle regioni virali 5'UTR, CORE, NS3, NS5A e NS5B mediante approccio amplicon based.

RISULTATI

I risultati di genotipizzazione ottenuti mediante NGS con il kit V-Seq HCV si sono dimostrati concordi con quanto atteso, identificando anche alcune coinfezioni. L'approccio mediante NGS ha permesso una migliore definizione dei sottotipi virali e l'identificazione di RASs per i genotipi HCV 1a e 1b con frequenza di mutazione >2%. La maggiore frequenza di mutazioni si è riscontrata nella regione NS3 (in particolare per le mutazioni Q80K e Y56F) e a seguire per le regioni NS5B e NS5A.

CONCLUSIONI

Un approccio diagnostico che permetta di identificare fin da subito il genotipo e l'eventuale presenza di RASs costituisce un importante supporto alla clinica. In questo contesto il kit V-Seq HCV si è dimostrato un dispositivo preciso e di facile utilizzo anche dal punto di vista dell'analisi e dell'interpretazione dei risultati.