P208

VIROLOGIA

CARATTERIZZAZIONE DEL VIRUS RILEVATO CON IL TARGET LTR CON APTIMA HIV-1 QUANT DX ASSAY.

A. Amendola [1], G. Sberna [1], S. Sarti [1], I. Abbate [1], C. Castilletti [1], M.R. Capobianchi [1]
[1]*Laboratorio di Virologia, INMI L. Spallanzani IRCCS, Roma*

INTRODUZIONE

Aptima HIV-1 Quant Dx (Aptima) è un test dual-target (pol e LTR) per il rilevamento e la quantificazione dell'HIV-1 RNA. Nella casistica del nostro laboratorio, il 94% dei campioni clinici è rilevato con pol; il restante 6% con LTR. Per chiarire il significato clinico delle CV rilevate con LTR, è stato iniziato uno studio finalizzato alla caratterizzazione del virus così rilevato.

METODI

Sono state allestite colture cellulari di PBMC CD8-depleti (PBMC) ottenuti da donatore sano e incubate con plasma o PBMC di pazienti HIV+ con CV rilevata o con pol o con LTR. Per l'isolamento virale da plasma è stato utilizzato il virus ottenuto da donatore HIV+, ultracentrifugato a 22.000g per 90 minuti a 4°C e incubato con PBMC precedentemente stimolati con 2,5 μg/ml di fitoemoagglutinina (PHA) per 3-5 giorni, per 1h e 30 min in incubatore a 37°C e 5% CO_2. Per l'isolamento virale da PBMC, sono stati utilizzati PBMC residui di pazienti HIV+, ottenuti dalle stesse provette dedicate al dosaggio della viremia. Le cellule sono state risospese a $2x10^6$/ml in terreno completo addizionato con IL-2 a 50.000 UI/ml e mantenute in coltura per un massimo di 6 settimane, stimolate con nuovi PBMC HIV- ad intervalli di 7-10 giorni. Ogni 3-4 giorni il supernatante (SN) è stato saggiato con Aptima per monitorare CV e con INNOTEST HIV Antigen mAb Fujirebio per misurare la produzione di p24. Tutti i campioni analizzati sono stati ottenuti da pazienti HIV+ in trattamento con farmaci antiretrovirali. I PBMC sono stati deprivati dei linfociti CD8 tramite LD Columns MACS e CD8 MicroBeads human MACS, Miltenyi Biotec.

RISULTATI

Solo nelle colture allestite con il virus ottenuto da plasma rilevato con pol è stata osservata un'infezione produttiva: infatti è stato misurato nel tempo un incremento significativo della CV e dei livelli di p24. Le colture allestite con il virus rilevato con LTR invece non hanno dato risultati di CV e p24 indicativi di replicazione virale.
Anche nella co-coltura con i PBMC di paziente HIV+ rilevato mediante pol, l'infezione è stata produttiva (HIV-RNA e livelli di p24 in costante aumento nel SN; presenza di numerosi sincizi cellulari, evidenti già dopo sette giorni), mentre nella co-coltura allestita con i PBMC ottenuti da paziente con CV LTR+, di nuovo, non sono stati osservati valori indicativi di produzione virale. Infatti, dopo un iniziale aumento, la CV è andata progressivamente diminuendo fino a raggiungere livelli non misurabili, senza essere mai accompagnata da parallela produzione di p24.

CONCLUSIONI

Il riscontro, in alcuni pazienti, di CV rilevate con LTR, ma non con pol, ne rende difficoltosa la gestione clinica. Dati ancora preliminari, ottenuti in-vitro, sembrano indicare che il virus rilevato nei pazienti HIV+ con LTR non sia in grado di innescare un'infezione produttiva. Sono in corso analisi di sequenza dell'RNA e del DNA virale associato ai PBMC a livello delle regioni target per completare la caratterizzazione.