

**SEQUENZIAMENTO SECONDO SANGER E NEXT-GENERATION SEQUENCING NELLA DETERMINAZIONE DELLE FARMACORESISTENZE DI HIV-1: METODICHE A CONFRONTO**

C. Perini<sup>2</sup>, A. Ramuscello<sup>2</sup>, S. Egiziano<sup>2</sup>, C. Scarparo<sup>3</sup>, P. Carraro<sup>2</sup>, L. Boatti<sup>1</sup>, M. Favarato<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SmartSeq Bioinformatics

<sup>2</sup>UOC Laboratorio Analisi-UOS Diagnostica Molecolare, AULSS 3 Serenissima, Venezia

<sup>3</sup>UOC Microbiologia, AULSS 3 Serenissima, Venezia

**INTRODUZIONE**

Con l'introduzione delle terapie antiretrovirali a partire dagli anni '90, la mortalità dei soggetti infetti da HIV è diminuita in modo significativo e la loro qualità di vita è nettamente migliorata. Nonostante ciò, un buon numero di pazienti presenta fenomeni di resistenza alle terapie antiretrovirali di prima linea, richiedendo così l'impiego di terapie più mirate. Ad oggi il gold-standard per la valutazione e la genotipizzazione delle farmacoresistenze da HIV è rappresentato dal sequenziamento Sanger. Lo scopo del lavoro è stato quello di comparare la metodica di sequenziamento tradizionale con la più avanzata tecnica di sequenziamento di nuova generazione (NGS).

**METODI**

Un totale di 24 campioni di sangue periferico di altrettanti pazienti affetti dal virus dell'HIV-1 sono stati esaminati in parallelo con i due metodi. L'RNA virale è stato estratto da 1 mL di plasma con lo strumento EasyMag (Biomerieux), quindi processato con il kit HIV-1 Solution (Arrow Diagnostics). In totale 10uL di RNA sono stati amplificati mediante OneStep RT-PCR e successivamente le regioni genomiche virali aventi un ruolo chiave nello sviluppo delle farmacoresistenze (Protease, RT, Integrase, gp120) sequenziate mediante NGS su piattaforma MiSeq (Illumina). L'analisi dei dati ottenuti tramite sequenziamento è stata effettuata mediante il software dedicato SmartVir (SmartSeq s.r.l.) che, basandosi su diversi algoritmi e database (Stanford, ANRS, Rego Institute, RenoGeno, ARCA, etc.), restituisce un report di tutte le varianti identificate nel campione, associate o meno a farmaco resistenza. I risultati così ottenuti sono stati confrontati con quelli del metodo Sanger.

**RISULTATI**

Una perfetta concordanza è stata ottenuta tra i due metodi. Inoltre, come atteso, l'approccio NGS ha permesso di identificare mutazioni con frequenza inferiore al limite di sensibilità del sequenziamento Sanger (15-20%). L'identificazione di queste mutazioni di resistenza presenti in basse percentuali, cioè tra il 5 ed il 15-20%, risulta di particolare interesse clinico, potendo rappresentare nuovi potenziali target terapeutici in pazienti refrattari alle terapie antiretrovirali di prima linea. Inoltre, l'analisi dei dati utilizzando diversi algoritmi e database ha evidenziato come mutazioni presenti con una frequenza superiore al 50% nella popolazione virale siano annotate, a volte, in maniera discordante nei diversi database.

**CONCLUSIONI**

I risultati ottenuti evidenziano come la combinazione tra tecnologia NGS e il kit "ARROWforNGS – HIV-1 Solution" permetta di raggiungere una sensibilità maggiore rispetto a metodiche commerciali (e non) applicate al sequenziamento Sanger, rappresentando uno strumento di notevole impatto nella gestione dei pazienti infetti da HIV-1. Non da meno, il metodo NGS si presenta vantaggioso sia in termini di turnaround time (TAT) sia per i costi ridotti. In ultimo, il software d'analisi potrebbe in futuro consentire la genotipizzazione più profonda dei ceppi virali responsabili del fenomeno di farmacoresistenza permettendo di valutare in corso di follow-up la loro espansione o riduzione.