

## Analisi genotipiche della resistenza agli antiretrovirali del virus dell'immunodeficienza umana (HIV)

Sabine Yerly, Radan Sitavanc

### Generalità <sup>(1)</sup>

Una resistenza agli antiretrovirali utilizzati per combattere l'HIV è stata osservata in circa il 70% dei pazienti viremici sottoposti a terapia e nel 10% dei pazienti appena infettati.

La resistenza è legata alla selezione di virus contenenti una o più mutazioni nei geni target dovute alla terapia (la trascrittasi inversa, la proteasi e una regione dell'involucro (gp41)).

Queste mutazioni vengono selezionate soprattutto quando la replicazione virale persiste anche sotto terapia, molto spesso quando la terapia è seguita in modo erratico.

Lo sviluppo della resistenza dipende dalla "barriera genetica" del virus alla terapia (numero di mutazioni necessarie affinché il virus diventi resistente). Essa dipende inoltre da fattori farmacologici e dall'efficacia della terapia. Senza la pressione selettiva di una terapia, i virus sensibili diventano, o ridiventano, maggioritari rispetto ai virus resistenti, in quanto questi ultimi hanno generalmente una capacità replicativa ridotta. Tuttavia, i virus resistenti restano presenti, ma le tecniche disponibili non consentono di individuarli.

Diversi studi hanno dimostrato l'importanza di modificare rapidamente la terapia dopo un fallimento virologico. In effetti, quando il paziente continua la stessa terapia dopo un fallimento virologico, si osserva un accumulo di mutazioni di resistenza che riduce le possibilità terapeutiche successive.

**Figura 1: Esempio di risultato di un'analisi genotipica di resistenza HIV del Laboratorio centrale di Virologia degli Ospedali Universitari di Ginevra (HUG)**

INTERPRETATION OF GENOTYPIC HIV RESISTANCE: ANRS VERSION 13 *				
<b>REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS</b>				
Nucleosides and nucleotides (NRTI)				
	Resistance	Possible resistance	No resistance	Mutations
ZDV				T215Y, M41L
ABC				M41L, T215Y
TDF				M41L, T215Y
DDI				M41L, T215Y, M41L, T215Y
3TC/FTC				
D4T				T215Y, M41L
Non-Nucleosides (NNRTI)				
	Resistance	Possible resistance	No resistance	Mutations
EFV				
NVP				
<b>PROTEASE INHIBITORS</b>				
	Resistance	Possible resistance	No resistance	Mutations
IDV				I84V, L90M, I54V, A71T, V77I
NFV				I84V, L90M, L10I, I54V, A71T, V77I
TPV/RTV				I54V, I84V
SQV/RTV				I84V, L90M
ATV/RTV				L10I, I84V, L90M
LPV/r				L10I, I54V, L63P, A71T, I84V, L90M
fosAPV/RTV				L10I, I54V, L63P, I84V
Subtype (RT): B				
Remarks:				
*www.hivfrenchresistance.org				

### Indicazioni <sup>(2, 3)</sup>

I test di resistenza sono parte integrante del trattamento terapeutico dei pazienti infettati dal virus dell'HIV. Essi consentono di evitare la prescrizione di antiretrovirali finalizzati a virus che contengono già mutazioni di resistenza trasmesse o selezionate sotto terapia.

Questi test sono raccomandati nelle seguenti situazioni:

- Infezione primaria o infezione recente (<1 anno)
- Infezione cronica:
  - Inizio di una prima terapia (da considerare caso per caso, in quanto i virus resistenti possono non venir rilevati)
  - Fallimenti terapeutici
- Gravidanza
- Profilassi post-esposizione (PEP), paziente sorgente (senza indugio per l'inizio della terapia)

Al contrario, un test di resistenza non è raccomandato nelle seguenti situazioni:

- Dopo una terapia discontinua (i virus resistenti possono diventare minoritari e non essere più rilevati)
- In caso di viremia < 1000 copie/ml (riproducibilità insufficiente della tecnica).

## Test genotipici di resistenza

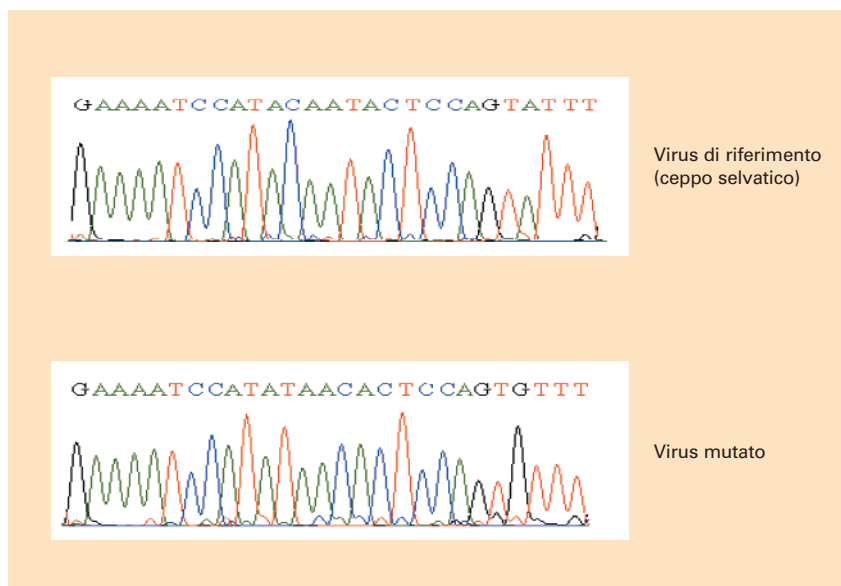
L'RNA del genoma dell'HIV viene estratto dal plasma. I geni della trascrittasi inversa, della proteasi e della regione gp41 (T-20) dell'involucro sono amplificati mediante PCR specifica, quindi sequenziati (figura 2). Le mutazioni associate a una resistenza vengono identificate. I dati di sequenziamento vengono conservati in un database che consente di effettuare un controllo di qualità (mediante allineamenti delle sequenze del follow-up di un paziente e analisi filogenetiche), nonché di reinterpretare i risultati, laddove necessario. Inoltre viene effettuata una sottotipizzazione dell'HIV. La tecnica impiegata consente di rilevare una mutazione presente in circa il 25% dei virus in circolo.

## Interpretazione <sup>(4)</sup>

Stabilire regole di interpretazione (algoritmi) dei test genotipici di resistenza è un esercizio lungo che richiede aggiornamenti frequenti. Gli algoritmi devono essere convalidati clinicamente. Questa convalida si fonda su studi di correlazione fra il profilo di mutazioni prima dell'inizio della terapia e della risposta virologica.

I risultati sono espressi attraverso antiretrovirali in tre livelli: nessuna resistenza, possibile resistenza e resistenza.

**Figura 2: Genotipizzazione HIV. Esempio di confronto di sequenze**



## Informazioni pratiche

<b>Prelievo</b>	<b>Sangue EDTA 6 ml, nessun prelievo in provette eparinizzate</b> (rischio di inibizione della PCR)
<b>Precauzioni</b>	Non effettuare prelievi il venerdì. Allegare al prelievo lo speciale questionario "Request form" debitamente compilato, disponibile su richiesta presso il vostro laboratorio
<b>Metodi d'analisi</b>	PCR e sequenziamento
<b>Tempistica</b>	10-15 giorni (analisi inviata al Laboratorio Centrale di Virologia degli Ospedali Universitari di Ginevra)
<b>Costo</b>	800 punti (valore del punto secondo tariffe dell'UFSP in vigore)

## In breve

***Il rilevamento delle mutazioni associate alla resistenza dell'HIV agli antiretrovirali consente di guidare la scelta terapeutica. In caso di fallimento del trattamento, il dosaggio degli antiretrovirali consente di riorientare la terapia. Dato che un'interruzione della terapia di diverse settimane può causare una reversione delle mutazioni, i test di resistenza in caso di fallimento della terapia devono essere effettuati prima dell'interruzione del trattamento.***

*Per ulteriori informazioni rivolgersi ai responsabili del vostro laboratorio.*

## Bibliografia

- (1) • Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. N Engl J Med 2004; 350: 1023-1035.
- (2) • Vandamme AM, Sonnerborg A, Ait-Khaled M, et al. Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. Antivir Ther 2004; 9: 829-848.
- (3) • Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. Clin Infect Dis 2003; 37: 113-128.
- (4) • Brun-Vezinet F, Costagliola D, Khaled MA, et al. Clinically validated genotype analysis: guiding principles and statistical concerns. Antivir Ther 2004; 9: 465-478.

Sabine Yerly, responsabile Biologia Molecolare, Laboratoire Central de Virologie (Prof. Luc Perrin), Hôpitaux Universitaires de Genève.

Radan Sitavanc, responsabile reparto di Sierologia, Unilabs Genève.