

Diagnosing HIV “window phase” in routine laboratory: a teaching case

Roberta Valentina Marotta¹, Rossana Baccalini², Alessandro Mauri², Marco Facca², Gabriella Palanza², Manuela Martucci², Raffaella Seminati², Gianlodovico Melzi d’Eri¹

1 Dip. di Medicina Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano

2 Laboratorio analisi chimico cliniche e microbiologiche, A.O. San Paolo, Milano

Key words: HIV, laboratory diagnosis, early infection

Diagnosi di HIV in “fase finestra” nella routine di laboratorio: un caso didattico

SUMMARY

Human immunodeficiency virus (HIV) is the causative agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). It is a retrovirus that inserts itself into the host’s DNA and use the host – cell’s replication mechanisms for its own perpetuation.

Two distinct species of HIV (HIV 1 and HIV 2) have been identified and they have a different global distribution. In this paper we describe a case of HIV early infection in an Italian man of forty years old.

From this example we want to stress the importance to consider with high attention the validation of a negative index of HIV antibodies. We advise to follow this procedure that allows to avoid the risk to report a false negative.

INTRODUZIONE

Il virus HIV è un retrovirus appartenente al genere lentivirus (1), il cui genoma (due copie di RNA a polarità positiva) è associato agli enzimi che concorrono alla sua replicazione ed inclusione (trascrittasi inversa, proteasi, integrasi).

In base alle conoscenze attuali si distinguono due ceppi: HIV-1, prevalentemente localizzato in Europa, America ed Africa centrale ed HIV-2, che si trova per lo più in Africa occidentale ed Asia. Come riportato dall’organizzazione mondiale della sanità (OMS) (3), l’HIV/AIDS rappresenta ad oggi la quinta causa di morte nel mondo, con una maggiore prevalenza nei paesi a basso reddito. In Italia, secondo i dati raccolti dal COA (2) (centro operativo AIDS), fonte 2010, sono presenti tra 143000 e 165000 persone HIV positive viventi, di cui 22000 con AIDS.

La diagnosi di infezione, partendo dal sospetto anamnestico-clinico, si basa sulla ricerca degli anticorpi anti-HIV 1 e 2, generalmente riscontrabili nel siero 6-12 settimane dopo l’infezione.

È tuttavia importante sapere che l’organismo impiega da 3 settimane a 6 mesi a produrre anticorpi anti HIV (“periodo finestra”), pertanto è consigliabile ripetere il test anche dopo 6 mesi dal comportamento a rischio.

Mediante la determinazione dell’antigene p24, ovvero dell’antigene rappresentante la struttura proteica più interna del virus HIV, è possibile rile-

vare l’infezione circa 2 settimane dopo la contaminazione del soggetto.

Presso il Laboratorio Analisi dell’A.O. San Paolo di Milano lo screening per la diagnosi di infezione da HIV si effettua mediante l’utilizzo di un test di quarta generazione (HIV Combi, Roche) che permette di determinare simultaneamente la presenza dell’antigene p24 e/o degli anticorpi anti-HIV 1 e 2.

Tale test viene eseguito mediante metodo Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) su immunoanalizzatore Modular E170 (Roche).

I risultati vengono calcolati automaticamente dal software, confrontando il segnale elettrochemiluminescente del campione con il valore di cutoff, ottenuto precedentemente mediante calibrazione:

- un risultato ≥ 1.0 indica un campione reattivo
- un risultato < 0.90 indica un campione non reattivo
- un risultato ≥ 0.90 e < 1.0 indica un campione borderline.

La sensibilità analitica dichiarata per il pannello di sierconversione è di 33 pg/mL.

La precisione interassay è stata calcolata su 60 replicati in giorni diversi sia con un controllo negativo PreciControl 1 HIV COMBI (0.173 ± 0.021 ; indice atteso: 0.170 ± 0.025); sia con controllo positivo PreciControl 2 HIV COMBI (14.3 ± 0.85 ; indice atteso: 14.0 ± 0.90).

I campioni che al test di screening risultano reattivi

Corresponding author: Valentina Marotta

Dip. Di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano

Via A. Di Rudini, 8 - 20142 Milano - Tel.: 02 81844237 - Fax: 02 81844027

E-mail: roberta.marotta@ao-sanpaolo.it; roberta.marotta@studenti.unimi.it

vi, dubbi o comunque non reattivi ma che si discostano dalla media dei negativi (0.100), vengono confermati su analizzatore Vidas (Biomérieux) mediante l'utilizzo del test automatizzato HIV DUO Ultra, anch'esso in grado di rilevare la presenza dell'antigene p24 e/o degli anticorpi anti HIV 1 e 2.

Tale dosaggio associa una reazione immunoenzimatica ad una rivelazione finale in fluorescenza a 450 nm (ELFA).

Il valore del segnale di fluorescenza è proporzionale alla presenza di anticorpi anti-HIV e/o di antigene p24.

I risultati vengono calcolati automaticamente dallo strumento:

- risultati ≥ 0.25 indicano un campione reattivo
- risultati < 0.25 indicano un campione non reattivo

La sensibilità analitica dichiarata per il pannello di sierconversione è di 11.5 pg/mL.

La precisione interassay è stata calcolata su 80 replicati in giorni diversi sia con controllo negativo C1 HIV (0.13 ± 0.018 ; indice atteso: 0.10 ± 0.020) sia con controllo positivo C2 HIV (4.3 ± 0.55 ; indice atteso: 4.0 ± 0.50).

Nel caso di positività ad entrambi i tests, sul medesimo campione, viene eseguito un test di conferma mediante immunoblotting (Innolipa, Bayer Siemens) che consente di evidenziare la presenza di anticorpi diretti contro le singole proteine virus-specifiche (gp120, gp41, p31, p24, p17, gp105, gp36).

Al fine di stabilire una diagnosi di infezione in atto, nei casi in cui le indagini sierologiche non consentano interpretazioni sicure, viene ricercato il singolo antigene p24. Il dosaggio viene effettuato su analizzatore Vidas mediante metodo ELFA (HIV P24 II) con una sensibilità pari a 3 pg/mL.

CASO CLINICO

Un uomo di 40 anni si presenta spontaneamente al centro prelievi dell'A.O. San Paolo di Milano e chiede di eseguire un test anti HIV.

Il test di screening eseguito mediante metodo ECLIA risulta negativo con un indice pari a 0.414 (cut-off 1.0). Considerando la media degli indici negativi per i campioni pari a 0.100, si decide di analizzare il medesimo siero con altro metodo (ELFA).

Il campione risulta reattivo con un indice pari a 1.00 (cut-off 0.25), ma il test di conferma mediante immunoblotting non evidenzia la presenza di anticorpi specifici diretti contro le proteine virali. Si esegue quindi un dosaggio per il singolo antigene p24 mediante metodo ELFA che fornisce risulta positivo (19 pg/mL). Il quadro sembra correlare con una probabile "fase finestra" dell'infe-

zione e il paziente viene da noi indirizzato al reparto di Malattie Infettive dell'A.O San Paolo.

Due giorni dopo il primo prelievo, vengono ripetuti i medesimi tests su un nuovo campione di siero: il dosaggio mediante metodo ECLIA, pur mostrando un incremento, risulta ancora negativo (indice 0.78), mentre quello con metodo ELFA risulta nuovamente positivo (indice 1.50). Anche il test per la ricerca della proteina p24 si conferma positivo mostrando un aumento della concentrazione di antigene (56 pg/mL).

Tre settimane dopo il paziente viene richiamato per un terzo prelievo di sangue sul quale vengono effettuati sia il test di screening sia il test di conferma mediante immunoblotting.

Il primo, metodo ECLIA, fornisce esito positivo (indice 400) e l'immunoblotting evidenzia la presenza delle bande gp41, p24 e p17, indicando una positività per HIV1.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nonostante le campagne di sensibilizzazione al test anti HIV degli ultimi anni abbiano determinato un incremento del test di screening, ad oggi il numero di nuove diagnosi in fase avanzata di malattia (numero di $CD4^+ < 200$ cell/mm³) rimane purtroppo ancora alto, con conseguente svantaggio per i pazienti che non possono usufruire dei benefici di una terapia iniziata precocemente.

Pertanto in assenza di forte sospetto clinico e di anticorpi anti-HIV nel siero sarebbe necessario escludere l'infezione acuta mediante dosaggio dell'antigene p24 e dell'HIV RNA. Tale procedura comporterebbe tuttavia un aumento considerevole dei costi.

Una strategia alternativa è rappresentata dall'utilizzo di kit ad alta sensibilità, combinati per la rilevazione simultanea di antigene ed anticorpo, che consentono una più rapida ed affidabile referenziazione rispetto ai tests commerciali precedenti che rilevavano la sola presenza anticorpale del virus HIV 1 e 2.

In tal modo è possibile diagnosticare una sierconversione precoce ed impostare una terapia adeguata con farmaci mirati ad impedire l'integrazione cellulare.

Nel caso clinico presentato, un indice negativo alto rispetto alla media (0.414) ha suscitato la nostra attenzione; di conseguenza si è deciso di valutare tale negatività con altro metodo più specifico (ELFA).

Comunque, la rilevazione nel primo campione di 19 pg/ml dell'antigene p24 ci permette di affermare che il metodo di screening, con sensibilità per il pannello di sierconversione pari a 33 pg/ml, non avrebbe potuto rilevare in tale siero la presenza del virus.

Invece, la presenza del virus nel secondo campione, nel quale si è determinata la concentrazione di 56 pg/ml dell'antigene p24, avrebbe dovuto essere rilevata anche mediante metodo ECLIA.

Tale attenzione, nel nostro laboratorio, ha consentito di non refertare un risultato falso negativo, evitando le gravi conseguenze facilmente intuibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Antonelli G, Clementi M, Pozzi G, Rossolini GM. Principi di microbiologia medica, *CEA editore* Milano 2008; 1-912
2. www.salute.gov.it
3. www.who.int