Il concetto svizzero per i test HIV – compendio aggiornato sul concetto tecnico e sul concetto di laboratorio

Nel 1985 l'Ufficio federale della sanità pubblica (UFSP), in collaborazione con la Commissione federale per i problemi inerenti l'AIDS (CFPA), ha introdotto un concetto di test HIV per ottimizzare in tutto il Paese l'attendibilità della diagnosi precisa di un'infezione HIV. Il concetto di test HIV comprende due settori: il concetto tecnico e il concetto di laboratorio. Il concetto tecnico disciplina i metodi con i quali rispondere in modo ottimale alle domande diagnostiche che si presentano. Il concetto di laboratorio disciplina i laboratori che si occupano delle diverse domande diagnostiche e dei compiti speciali nel settore della sanità pubblica (sistema di dichiarazione). Esso comprende tre livelli: i laboratori di screening, i laboratori di conferma e, come laboratorio di riferimento, il Centro nazionale per i retrovirus (CNR). Dal 26 giugno 1996 l'ordinanza concernente i laboratori di microbiologia e sierologia obbliga i laboratori attivi nella diagnostica HIV ad attenersi al concetto di test dell'UFSP (allegato 1 dell'ordinanza).

Già nel 1985 l'UFSP incaricò una commissione peritale di elaborare direttive e raccomandazioni volte a mantenere un'elevata qualità della diagnostica HIV e a migliorarla costantemente secondo lo stato della ricerca e dell'evoluzione. Oggi questa Commissione si chiama *Commissione peritale laboratorio e diagnostica HIV/AIDS* dell'UFSP, abbreviata *CLD*, ed è composta da responsabili dei laboratori di conferma e del CNR come pure da una rappresentanza adeguata dell'UFSP. Le sue raccomandazioni concernono sia il concetto tecnico che il concetto di laboratorio.

In adempimento a questi compiti e in armonia con il notevole progresso tecnico, negli ultimi vent'anni la CLD ha ripetutamente modificato il concetto di test HIV. Tutte le raccomandazioni sono state pubblicate nel Bollettino dell'UFSP mettendo in primo piano le innovazioni e menzionando solo superficialmente ciò che rimaneva invariato. Questo era sufficiente fintanto che ci si rivolgeva a un gruppo di persone ben informate sullo stato antecedente del concetto, ma siccome oggi nei laboratori come nelle autorità sanitarie sono subentrate molte nuove forze che non hanno seguito gli sviluppi del concetto sin dall'inizio, appare sensato e opportuno pubblicare una visione globale e aggiornata sulla diagnostica HIV e sulle sue strutture organizzative in Svizzera.

CONCETTO TECNICO – LE TRE DOMANDE DELLA DIAGNOSTICA HIV

Rispetto a vent'anni fa, quando si trattava soltanto di accertare se qualcuno era infetto da HIV (domanda 1), oggi il laboratorio HIV è confrontato ad uno spettro di problemi a cui si sono aggiunti due ulteriori quesiti cardinali. Non appena la diagnosi di un'infezione HIV è stabilita con certezza, si deve determinare subito l'identità del virus, in particolare le sue caratteristiche genetiche e biologiche (domanda 2), e l'attività dell'infezione, in particolare la carica virale (viral load; domanda 3). Conoscere l'identità del virus (HIV-1, HIV-2, virus del gruppo O dell'HIV-1) è una condizione indispensabile per la scelta del test adatto a determinare la carica virale e, nel caso in cui sia necessaria una terapia antiretrovirale (TAR), anche per la combinazione di una terapia efficace ottimale. Infatti, un medicamento derivato dal gruppo degli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI) è generalmente inefficace contro i virus del gruppo O e contro l'HIV-2. Per la scelta della terapia ottimale è importante anche conoscere precisamente le eventuali resistenze individuali del virus di un paziente contro i medicamenti antiretrovirali. Infine, è indispensabile conoscere la carica virale corretta insieme al numero delle cellule CD4+ per la decisione medica concernente una TAR e per la sorveglianza terapeutica. La tabella 1 offre una panoramica sul concetto tecnico attuale, ossia sui test che possono essere impiegati oggigiorno per rispondere alle tre domande. Si tratta di una scelta di test tra i quali ogni laboratorio deve determinare da sé il test o la combinazione di test ottimali per un determinato mandato di analisi. Le direttive in merito sono riportate nei riquadri corrispondenti e nelle tabelle 2–6 che si trovano in questi riquadri.

Oltre alle domande diagnostiche principali, la diagnostica HIV odierna tratta anche gli aspetti virologici qualitativi e quantitativi. È chiaro che le analisi supplementari, che comprendono pertanto una serie di altri parametri virali, migliorano ulteriormente l'affidabilità dell'effettiva diagnosi HIV, ovvero aumentano la specificità diagnostica. La certezza della diagnosi iniziale «confermato HIV positivo» è rafforzata considerevolmente dai successivi risultati positivi della determinazione della carica virale e dall'identificazione del sottotipo nell'ambito di eventuali test delle resistenze. Viceversa, nei pazienti a cui è appena stata attribuita una diagnosi HIV ma la cui carica virale non è evidenziabile non si deve solo valutare se è presente una variante di virus anomalo, ma si deve esaminare nuovamente se i criteri per la diagnosi di un'infezione HIV sono effettivamente soddisfatti.

Da queste considerazioni emerge anche che il medico curante deve fornire al laboratorio clinico il maggior numero possibile di informazioni sull'obiettivo dell'analisi HIV ri-

Tabella 1
Concetto tecnico attuale. Le tre domande di principio della diagnostica HIV e i test utilizzabili per rispondervi

Domanda 1. Una persona è infetta da HIV?

Livello di screening	Livello di conferma (laboratori di conferma e/o CNR)	
Test utilizzati sul **primo materiale** (siero o plasma)	Test utilizzabili sul **primo materiale**	Test utilizzabili sul **secondo materiale** (sangue EDTA) o su materiali seguenti
• Nei laboratori: test di screening della 4ª generazione (test combinato HIV-1/2; rileva gli anticorpi e l'antigene p24) • Negli studi medici: test rapido (rileva soltanto gli anticorpi – inadatto in caso di sospetto di primoinfezione!)	• Secondo, altro test di screening (3ª o 4ª generazione) • Test rapido • Line Immunoassay HIV-1/2 • (Western Blot)	• Secondo, altro test di screening (3ª o 4ª generazione) • Test rapido • Line Immunoassay HIV-1/2 • (Western Blot)
	• Antigene p24 + neutralizzazione	• Antigene p24 + neutralizzazione • HIV-1 RNA quantitativo (carica virale) • HIV-1 RNA (qualitativo) • HIV-1 DNA (qualitativo) • HIV-2 DNA (qualitativo) • PERT Assay • MEGA-PCR per HIV-1 DNA • Coltura + identificazione del virus

Domanda 2. Che caratteristiche ha il virus?

È HIV-1, HIV-2 o HIV-1 del gruppo O?	**Sono presenti resistenze contro medicamenti antiretrovirali?**
• Line Immunoassay, (Western Blot) • DNA-PCR per l'HIV-1 o HIV-2 • Primer e sonde e determinazione della sequenza che rilevano l'HIV-1 gruppo O	• Test delle resistenze genetiche • Test delle resistenze fenotipiche

Domanda 3. Quanto è elevata la carica virale?

Test utilizzato in primo luogo	Test alternativo
• HIV-1 RNA (quantitativo) –> concentrazione di particelle virali HIV-1 nel plasma (inadatto per HIV-2 e HIV-1 gruppo O)	• Attività RT con PERT Assay (indipendente dalla sequenza) –> concentrazione di tutte le particelle virali nel plasma

chiesta. Solo se si conoscono antecedenti e domande, è possibile scegliere il test idoneo. Queste informazioni devono essere imperativamente comunicate dal laboratorio di screening anche al laboratorio di conferma. La CLD stabilisce esplicitamente che non spetta al laboratorio di screening prescrivere al laboratorio di conferma quale test dovrebbe o potrebbe eseguire. Il laboratorio di screening affida solo il mandato di conferma. La scelta del o dei test necessari per adempiere a questo mandato è lasciata alla discrezione del laboratorio di conferma.

Domanda 1: una persona è infetta da HIV?

È proprio su questa domanda centrale che si basa il concetto di laboratorio HIV a tutti i livelli, ossia i laboratori di screening HIV (anche certi laboratori di studi medici che eseguono il test rapido HIV), i laboratori di conferma HIV e il Centro nazionale per i retrovirus (CNR).

Per quanto concerne gli algoritmi del test da impiegare va sottolineato che per la diagnostica HIV pediatrica nei neonati e nei lattanti fino a 18–24 mesi sono utilizzati altri metodi che per gli adulti e i bambini più grandi.

Diagnostica negli adulti e nei bambini di >24 mesi

Nell'ambito dei metodi impiegati per questa domanda primaria e centrale occorre distinguere tra test diretti e indiretti. I test indiretti accertano la risposta immunitaria di una persona infetta, in particolare la produzione di anticorpi HIV specifici. I test diretti evidenziano determinati componenti virali, ad esempio, le proteine virali come l'antigene p24, l'HIV-RNA o l'HIV-DNA oppure l'attività di determinati enzimi retrovirali come la trascrittasi inversa contenuta nelle particelle virali.

Nella fase precoce dell'infezione, la replicazione virale è di regola elevatissima. In pochi giorni, si osserva un elevato titolo di virus che tuttavia di regola si riduce nello spazio di poche settimane. Le particelle virali possono essere individuate nel plasma con la RT-PCR (*Reverse Transcription*-PCP) quantitativa, o altre procedure di amplificazione dell'acido nucleico che sono specifiche a una sequenza. Anche il test dell'antigene p24 risulta positivo durante questa fase. Poco dopo, i test sierologici rilevano i primi anticorpi.

Dato che il rischio di contagio nella fase iniziale dell'infezione, a causa dell'elevato titolo del virus e all'assenza totale di anticorpi neutralizzanti o di altre difese, è considerevole, questo stadio deve essere imperativamente rilevato nello screening HIV. A tal scopo, il mezzo più efficace è oggigiorno il test combinato anticorpi/antigene della 4ª generazione che rileva sia l'antigene

p24 che gli anticorpi (test combinato). Sin dal 1° marzo 2004 la CLD raccomanda quindi per lo screening di utilizzare un test combinato anticorpi/antigene della 4ª generazione, laddove sia tecnicamente possibile, ossia in tutti i laboratori diagnostici (cfr. riquadro «Raccomandazioni della CLD per lo screening HIV nei laboratori clinici e negli studi medici»). Dato che nello studio medico lo screening con il test rapido HIV-1/2 non rileva l'antigene p24, i campioni dei pazienti con sospetto clinico o anamnesico di primoinfezione HIV devono imperativamente essere esaminati in laboratorio con un test che rilevi l'antigene p24 (la soluzione più semplice a questo scopo è il test combinato).

Oggi i laboratori di conferma dispongono, oltre al Western Blot (WB) disponibile da vent'anni, di una serie di altri test (tabella 1). A seconda del laboratorio e del campione può essere opportuno eseguire un determinato test o una combinazione di determinati test piuttosto di altri. Sin dal 1998 la CLD ha quindi deciso di scostarsi dalla regolamentazione rigorosa del procedimento di conferma che esigeva un Western Blot, definendo al suo posto combinazioni di risultati positivi nel primo e nel secondo materiale che devono essere soddisfatte per la diagnosi sicura di un'infezione HIV (cfr. riquadro «Raccomandazioni della CLD per lo screening e la conferma nei laboratori di conferma»). Tali combinazioni minime che confermano un'infezione HIV possono essere ad esempio (l'elenco non è esaustivo): (1) test combinato reattivo nel primo materiale e Line Immunoassay positivo nel secondo materiale oppure (2) test combinato reattivo e secondo test di screening reattivo nel primo materiale e carica virale sufficientemente elevata a >1000 copie/ml di RNA dell'HIV-1 nel secondo materiale. La decisione (e la relativa responsabilità) riguardo a quale combinazione utilizzare spetta al laboratorio di conferma.

Per la sicurezza di una diagnosi «infetto da HIV» è essenziale il principio che per questa diagnosi sono necessari risultati *sempre* concordanti su almeno due diversi materiali di analisi, ossia sul primo materiale e sul secondo. Inoltre, è importante che, in caso di risultato reattivo del test combinato e di risultato negativo o dubbio del test di ricerca degli anticorpi eseguito per conferma (test di screening della 3ª generazione, Line Immunoassay o Western Blot), sia sempre effettuato anche un test per identificare i componenti virali, più semplicemente un test dell'antigene p24 separato. Altrimenti, le primoinfezioni sfuggono all'individuazione nello stadio della pre-sieroconversione.

È fuori dubbio che questi algoritmi possono anche causare situazioni dubbie: cosa fare quando due diversi test di screening risultano altamente positivi con il primo materiale (indizio sicuro di un'infezione HIV), ma la carica virale nel secondo materiale non è evidenziabile o è solo bassa? In questo caso, il risultato positivo *non* è confermato e si devono eseguire altri test per accertare l'infezione. In particolare, va chiarito se si tratta effettivamente di un'infezione da HIV-1 del gruppo M o non piuttosto di un'infezione con virus molti più rari del tipo HIV-2 o del gruppo O dell'HIV-1. In questo caso, quando in base alla forte reattività in due diversi test di screening è presumibile una risposta immunologica soddisfacente, il Line Immunoassay per l'HIV-1/2 di Innogenetics (Inno-Lia HIV-1/2 Score) rappresenta sicuramente il test più facile e più economico per escludere un'infezione da HIV-2. Questo test, derivato dal recente Western Blot, utilizza proteine ricombinate e/o peptidi sintetici di entrambi i virus HIV-1 e HIV-2.

L'HIV-2 è mal riconosciuto dalle procedure standard usate attual-

RACCOMANDAZIONI DELLA CLD PER LO SCREENING HIV NEI LABORATORI CLINICI E NEGLI STUDI MEDICI

Screening nei laboratori clinici

Dato che il test combinato anticorpi/antigene rileva meglio la fase iniziale dell'infezione HIV rispetto ai test della terza generazione che si basano esclusivamente sulla messa in evidenza degli anticorpi, la CLD raccomanda ai laboratori clinici di impiegare generalmente nello screening un test della quarta generazione. In caso di risultato negativo di un'indagine, malgrado il sospetto anamnesico o clinico di una primoinfezione, si deve considerare l'eventualità che il test risultava negativo perché eseguito troppo presto. In questo caso, si deve eseguire un controllo una o due settimane dopo (ancora con un test combinato). Per escludere definitivamente un'infezione HIV dopo un'esposizione, è necessario eseguire inoltre un test dopo tre mesi. Nella tabella 2 vengono descritti l'interpretazione e gli accertamenti ulteriori nei laboratori clinici.

Screening nello studio medico

Negli studi medici in cui non possono essere effettuati test della quarta generazione per motivi tecnici, si può continuare ad eseguire il test rapido HIV quando si tratta di escludere un'infezione HIV presente da lungo tempo (più di tre mesi dopo l'esposizione potenziale). In caso di sospetto di primoinfezione, il sangue deve essere imperativamente inviato a un laboratorio che esegua regolarmente un test combinato (anticorpi + antigene p24) della quarta generazione (da verificare prima dell'invio!). Nella tabella 3 vengono descritti l'interpretazione e gli accertamenti ulteriori negli studi medici.

Se il risultato di un test di ricerca HIV effettuato in un laboratorio clinico o in uno studio medico è reattivo, deve essere inviato un nuovo prelievo di sangue EDTA a un laboratorio di conferma. Il vantaggio di un prelievo di sangue fresco EDTA consiste nel fatto che nel laboratorio di conferma, oltre al test sierologico di conferma, può essere eseguita una quantificazione dell'HIV-1 RNA (determinazione della carica virale). In questo modo si accresce sostanzialmente la sicurezza della diagnosi HIV che è comunque indispensabile per poter fare il punto della situazione nei pazienti HIV positivi.

Tabella 2
Screening nel laboratorio clinico

TEST E RISULTATO	INTERPRETAZIONE	ACCERTAMENTI ULTERIORI
Test combinato HIV-1/2 (anticorpi + antigene p24) della quarta generazione certificato dalla CE		
negativo	nessun indizio di un'infezione HIV	In caso di sospetto di primoinfezione ripetere dopo 1 o 2 settimane
valore limite	dubbio	Se si ripete valore limite: inviare il sangue EDTA entro 1 o 2 settimane direttamente al laboratorio di conferma. Risultato al committente secondo l'esito del laboratorio di conferma
reattivo	nessun risultato definitivo	Inviare il materiale al laboratorio di conferma oppure inviare un nuovo prelievo di sangue EDTA direttamente al laboratorio di conferma. Risultato al committente secondo l'esito del laboratorio di conferma

Tabella 3
Screening nello studio medico

TEST E RISULTATO	INTERPRETAZIONE	ACCERTAMENTI ULTERIORI
Test rapido certificato dalla CE		
negativo	nessun indizio di un'infezione HIV	In caso di sospetto di primoinfezione inviare al laboratorio di conferma
valore limite	dubbio	Inviare sangue EDTA al laboratorio di conferma
reattivo	nessun risultato definitivo	Inviare sangue EDTA al laboratorio di conferma

mente in Svizzera per la determinazione della carica virale, il test HIV-1 Monitor™ di Roche e il rispettivo successore, il test dell'HIV-1 COBAS TaqMan riconoscono a malapena l'HIV-2 e non riconoscono del tutto i virus del gruppo O dell'HIV-1. Anche altri test per la quantificazione dell'HIV-1 RNA meno utilizzati in Svizzera come il NucliSens® HIV-1 QT di Organon Teknika, che si basa sul principio NASBA, o il VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) di Bayer non riconoscono questi virus [1]. I virus del gruppo O dell'HIV-1 sono riconosciuti solo dall'Abbott LCx HIV-1, che però non riconosce l'HIV-2 [2, 3]. Una carica virale non evidenziabile, o solo poco, in tali test con lo screening risultato chiaramente positivo è quindi compatibile con un'infezione da HIV-2. Anche i virus del gruppo M dell'HIV-1 sono talvolta mal individuati da procedure di amplificazione dell'acido nucleico legati ad una sequenza specifica. In casi rari esistono virus del sottotipo B decisamente sottovalutati in questi procedimenti. Infine, i pazienti il cui virus è stato mal riconosciuto dal test devono essere distinti dai pazienti il cui virus è stato ben riconosciuto, ma che presentano effettivamente nessuna o poche particelle virali nel plasma e ciononostante mostrano un numero decrescente di cellule CD4.

In tutti questi casi, oltre al Line Immunoassay, viene eseguito con profitto un PERT-Assay per verificare una concentrazione virale bassa con questo metodo indipendente dalla sequenza. Se vengono alla luce discrepanze notevoli rispetto al risultato del test di una sequenza specifica, si devono ricercare le cause e determinare una soluzione ottimale per la quantificazione del virus. Questi sono compiti speciali tipici del CNR.

Per la differenziazione tra HIV-1 e HIV-2 viene preferibilmente utilizzato l'Inno-Lia HIV-1/2 Score. Questo test è molto più adatto del Western Blot specifico per i due tipi a distinguere tra HIV-1 e HIV-2. In certi casi, può anche indicare la presenza di un'infezione da gruppo O dell'HIV-1.

In casi rari, nonostante forti sospetti di infezione da HIV-1, come, ad esempio, dopo una lunga esposizione non protetta con un partner sicuramente positivo all'HIV-1, un risultato più volte reattivo nel test di screening non può essere confermato senza dubbi con un test ottenuto in commercio (inclusi i procedimenti di PCR commerciali). Per questi casi, in cui si deve assumere una concentrazione estremamente bassa di cellule infette da HIV, ammesso che si tratti effettivamente di un caso di contagio, il CNR ha sviluppato una PCR diagnostica ultrasensibile, la MEGA-PCR per l'HIV-1. Questa esamina campioni di DNA molto grandi (fino a 500 µg invece dei soliti 1–2 µg) di modo che la sensibilità aumenti in modo corrispondente a più del centuplo. Il test è ideale per la diagnosi di persone con risultato dello screening persistentemente positivo, per le quali il WB è compatibile con un'infezione precoce, ma in cui non è avvenuta una sieroconversione completa [4].

Diagnostica nei neonati e nei lattanti

Dato che gli anticorpi IgG materni, e quindi anche gli anticorpi HIV specifici, sono trasmessi al feto per via attiva transplacentare in alta concentrazione, tutti i figli di madri HIV positive nascono con un'alta concentrazione di anticorpi HIV, e sono pertanto «HIV positivi». I test degli anticorpi non possono essere utilizzati per la diagnosi pediatrica di infezione da HIV fino a completa scomparsa di questi anticorpi, ossia fino ai due anni di età.

Soltanto i test per mettere in evidenza i componenti virali (RNA o DNA dell'HIV, antigene p24), eseguiti con profitto all'età di 1, 3 e 6 mesi, sono efficaci per la prova dell'infezione HIV in questo periodo. A 24 mesi viene effettuato un test finale, ossia un test degli anticorpi HIV.

Anche qui va notato che i virus del gruppo O dell'HIV-1 e HIV-2 non sono riconosciuti dai procedimenti spesso impiegati in Svizzera per mettere in evidenza l'HIV-1 RNA o DNA o lo sono soltanto in modo insufficiente. In questi casi, i risultati negativi di questi test di routine non significano assolutamente nulla! Se il tipo di HIV della madre non è noto, si raccomanda di eseguire un Line-Immunoassay nei primi campioni di sangue del neonato affinché si possa in seguito utilizzare il test ottimale per il virus. Preferibilmente ci si dovrebbe rivolgere ad un laboratorio con esperienza nella diagnostica HIV pediatrica. I laboratori di conferma o il CNR possono fornire informazioni utili.

Nei bambini più grandi (di oltre 24 mesi) può essere impiegato lo stesso algoritmo che negli adulti. Va notato tuttavia che occasionalmente il Line-Immunoassay o il Western Blot può ancora trovare tracce degli anticorpi HIV materni fino all'età di 24 mesi, che spariscono successivamente.

Domanda 2: che caratteristiche ha il virus?

La definizione di determinate caratteristiche genetiche o biologiche del virus può rivestire una grande importanza per scegliere i test volti alla sorveglianza dell'infezione o alla composizione della terapia antiretrovirale. Un classico esempio è

RACCOMMANDAZIONI DELLA CLD PER LO SCREENING E LA CONFERMA NEI LABORATORI DI CONFERMA

Principi generali:

Una diagnosi certa di un'infezione HIV richiede risultati positivi concordanti di diversi test che devono essere eseguiti in parte sul primo materiale, in parte sul secondo. La scelta dei metodi e degli algoritmi di conferma spetta al laboratorio di conferma, tenendo conto di determinate direttive generali specificate qui di seguito e nelle tabelle 1, 4, 5 e 6.

In un laboratorio di conferma possono essere effettuate per la conferma ulteriori indagini direttamente su campioni reattivi. Visto che di regola il primo materiale è un siero, si dovrà procedere in particolare a un altro test di screening, a un Line Immunoassay o a un test dell'antigene p24, inclusa la neutralizzazione. Si può quindi avere una conferma dell'esito reattivo dello screening e la differenziazione per tipi in molti casi già sul primo materiale. Per avere una diagnosi certa e differenziata di un'infezione HIV è però indispensabile un secondo materiale (sangue EDTA) al fine di escludere l'eventualità di uno scambio o di una contaminazione del primo materiale e per determinare e valutare la carica virale. La conferma di un risultato reattivo dello screening nel primo materiale può tuttavia anche essere fornita in modo completo dal nuovo prelievo di secondo materiale (sangue EDTA).

I metodi a disposizione per la conferma figurano nella tabella 1. La tabella 4 mostra schematicamente come procedere in caso di diversi esiti a livello dello screening e della conferma. Le tabelle 5 e 6 mostrano quali combinazioni di risultati positivi di test sul primo e sul secondo materiale sono sufficienti per la conferma di un'infezione HIV conformemente al concetto di test dell'UFSP.

La procedura di conferma non risponde soltanto alla domanda se una persona è infetta da HIV, ma identifica anche il tipo di virus (HIV-1 e/o HIV-2). In caso di HIV-1, si devono raccogliere il più possibile anche i dati sul gruppo virale (M o O), inoltre occorre identificare in generale le varianti dei virus che a causa della sequenza del genoma diversa non possono essere quantificate adeguatamente con i test della carica virale attuali.

Ai fini di una differenziazione ottimale dell'HIV-1 e dell'HIV-2, per tutti i pazienti appena diagnosticati si devono eseguire un Line Immunoassay e più precisamente l'Inno-Lia HIV-1/2 Score. Questo test può fornire indicazioni anche su un'infezione con un virus del gruppo O. Nelle persone con primoinfezione HIV si deve aspettare la sieroconversione per differenziare i tipi con il Line Immunoassay.

Va notato che la più lieve contaminazione con un siero altamente positivo nel Line Immunoassay (come anche nel Western Blot) può facilmente dare risultati falsamente positivi.

Il laboratorio di conferma deve eseguire imperativamente il primo test della carica virale in tutti i pazienti appena diagnosticati. Conoscere la concentrazione dell'HIV-1 RNA nel plasma è importante per riconoscere i virus che sono mal rilevati dai test della carica virale attuali.

Più risultati indeterminati non daranno mai un risultato positivo.

La conferma deve essere effettuata limitando il più possibile i costi.

Un risultato reattivo di un test combinato di ricerca HIV-1/2 significa che sono stati individuati gli anticorpi specifici HIV e/o l'antigene p24. La procedura di conferma non deve limitarsi alla messa in evidenza degli anticorpi, ma deve in particolare comprendere anche un test per i componenti virali (antigene p24, HIV-1 RNA) in caso di risultato negativo di un test degli anticorpi eseguito a parte. Altrimenti, le primoinfezioni HIV passano inosservate nello stadio della pre-sieroconversione.

Nei casi di primoinfezioni HIV o di «recent infection» (contagio avvenuto probabilmente negli ultimi 6 mesi) si deve eseguire inoltre un esame delle resistenze in un laboratorio autorizzato.

Tabella 4
Schema su come procedere in caso di diversi esiti nello screening e nella conferma nei laboratori di conferma. Per i dettagli riferirsi alle tabelle 5 e 6!

Screening	**Conferma (può essere effettuata sul primo o sul secondo materiale)**			
Test combinato (anticorpi + antigene p24) della quarta generazione	Interpretazione	Risultato del test di conferma	Interpretazione	Accertamenti ulteriori
negativo	nessun indizio di un'infezione HIV			In caso di sospetto di primoinfezione: ripetere dopo 1 o 2 settimane; qualora il plasma sia disponibile, determinare direttamente la carica virale
valore limite	dubbio	positivo	sospetto di primoinfezione	Nel primo materiale: richiedere un campione (EDTA) per escludere uno scambio, determinare la carica virale; in caso di primoinfezione confermata, esame delle resistenze in un laboratorio autorizzato Nel secondo materiale: carica virale; in caso di primoinfezione confermata, esame delle resistenze in un laboratorio autorizzato
		dubbio	dubbio	–> CNR
		negativo (anticorpi e componenti virali)	falso reattivo	Nessuna indicazione di un'infezione HIV
reattivo	sospetto di un'infezione HIV	positivo	infezione da HIV confermata	Nel primo materiale: richiedere un secondo campione (EDTA) per escludere uno scambio, determinare la carica virale; in caso di primoinfezione confermata, esame delle resistenze in un laboratorio autorizzato Nel secondo materiale: carica virale; in caso di primoinfezione confermata, esame delle resistenze in un laboratorio autorizzato
		dubbio	dubbio	–> CNR
		negativo (anticorpi e componenti virali)	falso reattivo, contaminazione o scambio di campioni	Richiedere nuovi campioni

dato dalla differenziazione tra HIV-1 e HIV-2 (cfr. tabella 1). Questa distinzione è importante per quanto concerne la prognosi generale (l'HIV-2 è di gran lunga meno aggressivo dell'HIV-1), la probabilità di un contagio a terzi (inclusa la trasmissione madre-figlio), la determinazione della carica virale, l'esecuzione di test delle resistenze e infine la composizione della terapia antiretrovirale. Non tutti i medicamenti impiegati contro l'HIV-1 sono efficaci anche contro l'HIV-2; soprattutto nessuno degli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI) e neppure il Tenofovir hanno effetto contro l'HIV-2. Lo stesso avviene anche per i virus del gruppo O dell'HIV-1. Infatti, gli NNRTI sono per lo più inefficaci contro tali virus e la carica virale non può essere determinata con le procedure standard per l'HIV-1 RNA. Contrariamente all'HIV-2, i virus del gruppo O sono tuttavia aggressivi alla stessa stregua dei virus del gruppo M dell'HIV-1.

Il riconoscimento di infezioni da HIV-2 e HIV-1 del gruppo O deve pertanto avere luogo il più presto possibile ed essere considerato come parte imprescindibile della prima diagnosi di un'infezione.

Identificazione di infezioni da HIV-2 o HIV-1 del gruppo O

Un elevato sospetto di un'infezione da HIV-2 è presente nelle persone che hanno un legame epidemiologico con l'Africa occidentale (ad esempio, Costa d'Avorio, Gana, Senegal, Guinea-Bissau, Camerun) o con il Portogallo, un tempo potenza coloniale in queste regioni. La definizione avviene prima con test sierologici, in particolare il Line Immunoassay. I risultati positivi all'HIV-2 in questo test sono accertati dalla PCR per l'HIV-2, test che deve essere utilizzato anche in caso di risultati dubbi. L'HIV-2 RNA nel plasma

spesso non è evidenziabile neanche in pazienti non trattati con terapie, in particolar modo in persone ancora asintomatiche. Per confermare o escludere l'infezione da HIV-2 con la PCR è quindi imperativo inviare anche sangue EDTA e non solo plasma. È indispensabile effettuare un accertamento con la PCR soprattutto quando gli anticorpi reagiscono con gli antigeni dell'envelope sia dell'HIV-1 che dell'HIV-2 identificando così una probabile doppia infezione.

Anche in Svizzera sono stati scoperti alcuni pazienti infetti da HIV-1 del gruppo O; questi presentano tipicamente un legame epidemiologico con i Paesi dell'Africa centrale (Camerun, Gabun, Guinea equatoriale). Il Line Immunoassay può fornire indicazioni sulla presenza di un'infezione del gruppo O (reattività sovraproporzionale al sgp120 rispetto alla reattività al gp 41) in combinazione con una carica virale non individuabile (tranne con l'Abbott LCx HIV-1); la conferma è ottenuta con la PCR di una sequenza specifica oppure con una determinazione della sequenza del gene *gag* (eseguita presso il CNR).

In caso di HIV-2 e gruppo O dell'HIV-1 la carica virale non può quindi essere determinata con i test per l'HIV-1 RNA usati in Svizzera. Si è posta come alternativa il PERT (*Product Enhanced Reverse Transcriptase*) Assay che quantifica la particella virale non sulla base dell'HIV-RNA contenuto in essa, ma sulla base dell'attività della trascrittasi inversa, quindi indipendentemente dalla sequenza.

Nei pazienti con un numero delle cellule CD4 in rapida diminuzione o già basso, nonostante una carica virale bassa in un test che si basa sulla RT-PCR, non si deve mai iniziare una terapia senza aver escluso dapprima un'infezione da HIV-2 o da virus del gruppo O dell'HIV-1!

Test delle resistenze

La domanda, sicuramente più frequente e più importante a livello clinico, relativa alla caratteristica del virus esamina se il virus di un paziente presenta resistenze individuali contro i medicamenti antiretrovirali. Il test delle resistenze è consigliato (i) nella primoinfezione HIV-1, (ii) prima dell'inizio della terapia, in una persona infetta dopo il 1997, ossia praticamente in tutti i pazienti per i quali si discute oggi una prima terapia, (iii) prima di una terapia di salvataggio o di un cambiamento di terapia per altri motivi, (iv) in gravidanza prima dell'inizio della profilassi antiretrovirale, (v) nei bambini infetti malgrado una profilassi antivirale e (vi) in pazienti originari in caso di profilassi post-esposizione. Naturalmente, le indicazioni (i) – (iii) e (vi) non valgono solo per gli adulti, ma anche per i bambini infetti da HIV.

Il test delle resistenze viene eseguito per lo più come test delle resistenze genetiche nel quale l'HIV-1 RNA viene isolato dal plasma, sottoposto a trascrittasi inversa, amplificato ed esaminato mediante una sequenza del segmento del genoma (codificante per RT, proteasi, proteina transmembrana gp41, integrasi, ecc.) per cercare mutazioni legate sul piano delle proteine a una resistenza contro uno o più medicamenti. In base a questi dati viene allestita, per mezzo di algoritmi informatizzati, un'interpretazione dell'efficacia presumibile dei diversi medicamenti antiretrovirali usati. I test per le resistenze fenotipiche, analogamente a quanto avviene per la determinazione delle resistenze batteriche, esaminano invece direttamente in vitro se e quanto viene inibita la replicazione del virus del paziente in presenza di medicamenti antiretrovirali dati individualmente in confronto al virus wild-type.

I test delle resistenze genetiche accertano contemporaneamente anche il sottotipo di HIV-1. Conoscere i sottotipi può essere importante per valutare se la carica virale di un paziente con un procedimento RT-PCR dipendente dalla sequenza è veramente corretta. Infatti, certi ceppi virali di forme ricombinanti circolanti di HIV-1, ad esempio CRF02_AG, non sono del tutto individuabili dal test RT-PCR di Roche [5]. L'informazione sulla sequenza HIV disponibile per ogni paziente esaminato consente anche indagini epidemiologiche molecolari. I dati della sequenza sono raccolti sistematicamente dal 2003 in un registro centrale dei dati anonimizzato su Internet nell'ambito degli studi svizzeri sulle resistenze HIV. I dati relativi ai pazienti del Swiss HIV Cohort Study (SHCS) sono inoltre caricati automaticamente sulla banca dati del SHCS. In futuro, per una parte sempre più grande di pazienti del SHCS, anche i sottotipi di HIV e l'identità molecolare individuale dei virus potranno essere inclusi nella ricerca.

Domanda 3: quanto elevata è la carica virale?

Questa domanda è importante per la stima individuale della prognosi di un paziente e, qualora sia eseguita una TAR, per il controllo dell'efficacia della stessa. La risposta è ottenuta misurando la concentrazione dei componenti virali definiti (tabella 1). Negli ultimi anni si è affermata la determinazione quantitativa dell'HIV-1 RNA nel plasma, ossia la carica virale. Il numero di copie/ml diviso due corrisponde teoricamente alla concentrazione delle particelle virali. In Svizzera il test generalmente usato per la misurazione della carica virale è l'Amplicor HIV-1 Monitor™ di Roche, rispettivamente il suo successore, il COBAS Ampliprep/TaqMan HIV-1 Test. Di regola questo test è utilizzato in una variante ultrasensibile con un limite di quantificazione inferiore pari a 50 copie/ml (nel TaqMan 40 copie/ml).

Come menzionato precedentemente, le domande diagnostiche, le domande sulle proprietà virali e le domande sulla carica virale sono spesso strettamente legate le une alle altre: dato che l'HIV-2 e il gruppo O dell'HIV-1 non sono riconosciuti dall'HIV-1 Monitor™ o dal TaqMan HIV-1 Test, la carica virale in queste infezioni non può essere determinata con questi test. Di conseguenza è importante che l'HIV-2 e il gruppo O siano identificati già durante la fase di diagnosi.

La CLD raccomanda a tal scopo di eseguire un test Inno-Lia HIV-1/2 Score per tutte le nuove diagnosi di infezione HIV. Nei pazienti diagnosticati allo stadio di pre-sieroconversione o di sieroconversione in base a un test positivo dei componenti virali (HIV-1 RNA, HIV DNA, antigene p24), si deve aspettare la sieroconversione per identificare il tipo di HIV e in seguito procedere con l'Inno-Lia HIV-1/2 Score. Le indagini sui pazienti infetti da HIV-2 hanno dato come risultato che nel test della carica virale HIV-1 di Roche certi ceppi HIV-2 reagiscono con la

stessa efficienza del ceppo del sottotipo B dell'HIV-1. Ad esempio, con l'Amplicor HIV-1 Monitor versione 1,5 è stata misurata in un soggetto con HIV-2 una carica virale di 55 000 copie/ml; in questo caso, la vera carica virale dell'HIV-2 è stata sottovalutata solo di 0,58 log, ossia di un fattore 4. Una carica virale elevata non indica quindi necessariamente la presenza di un'infezione HIV-1! In altri casi di soggetti con HIV-2, l'Amplicor HIV-1 Monitor ha mostrato tuttavia una carica virale inferiore di almeno 2 log rispetto alla vera concentrazione [6].

Nei casi dubbi, in particolare in caso di pazienti diagnosticati con HIV da lungo tempo, ma per i quali non è certo che sia stata effettuata una diagnosi dell'HIV-2, è opportuno eseguire un Line Immunoassay. Il test deve essere eseguito anche nei casi in cui il test della carica virale ha dato un risultato inaspettatamente basso e inadeguato alla situazione clinica.

Nonostante la sensibilità generalmente buona ai virus del gruppo M dell'HIV-1, l'HIV-1 Monitor™ o il COBAS TaqMan [5] possono avere difficoltà a riconoscere le sequenze di alcuni di questi virus. A seconda della dinamica locale dell'epidemia HIV, la frequenza di questi problemi può cambiare. Nella combinazione «numero delle cellule CD4 basso o in diminuzione malgrado una carica virale sempre bassa» sono sempre giustificati dubbi sulla validità dei risultati della carica virale. Dato che la carica virale può essere determinata in alternativa anche indipendentemente dalla sequenza per mezzo della misurazione della trascrittasi inversa inclusa nelle particelle HIV, in questi casi si dovrebbe eseguire il PERT Assay (presso il CNR). Questo test viene utilizzato anche per la determinazione della carica virale nell'HIV-2 e HIV-1 del gruppo O.

Tabella 5
Combinazione di risultati di test HIV sul primo e sul secondo materiale sufficienti per la conferma di un'infezione HIV. Vale per i laboratori di conferma che eseguono test di conferma già sul primo materiale.

Screening	**Test di conferma**			
Test combinato HIV-1/2 (anticorpi + antigene p24) della quarta generazione	Test di conferma sul **primo materiale** (siero)	Risultati necessari sul **primo materiale**	Risultati necessari sul **secondo o successivo materiale** (sangue EDTA)	Osservazioni
Reattivo	*altro* test di screening (3ª o 4ª generazione)	reattivo	Line Immunoassay positivo all'HIV-1 HIV-1 RNA ≥1000* copie/ml	Infezione HIV-1 del gruppo M
			Line Immunoassay positivo all'HIV-2 HIV-2 DNA PCR positivo (test presso il CNR)	Infezione HIV-2: determinazione alternativa della carica virale al CNR
	Line Immunoassay HIV-1/2	HIV positivo/HIV-1	HIV-1 RNA ≥1000* copie/ml	Infezione HIV-1 del gruppo M
		HIV positivo/HIV-2	HIV-2 DNA PCR positivo (test presso il CNR)	Infezione HIV-2: determinazione alternativa della carica virale al CNR
		HIV positivo/HIV-1; con o senza sospetto sierologico di gruppo O	HIV-1 RNA (Roche) non evidenziabile HIV-1 RNA o HIV-1 DNA positivo con Primers/Probes, che riconoscono l'HIV-1 del gruppo O. Analisi della sequenza nel gene gag (test presso il CNR)	Infezione HIV-1 del gruppo O: determinazione alternativa della carica virale al CNR
	Test dell'antigene p24	reattivo e neutralizzazione positiva	HIV-1 RNA ≥1000* copie/ml Line Immunoassay positivo all'HIV-1 (aspettare la sieroconversione!)	Infezione HIV-1 del gruppo M
		reattivo e neutralizzazione positiva	Line Immunoassay positivo all'HIV-2 (aspettare la sieroconversione!) HIV-2 DNA PCR positivo (test al CNR)	Infezione HIV-2: determinazione alternativa della carica virale al CNR

* in caso di HIV-1 RNA evidenziabile in una concentrazione inferiore a 1000 copie/ml esiste il sospetto di una variante di virus mal individuata con la RT-PCR: in questo caso la carica virale deve essere verificata con il PERT Assay dal CNR. Lo stesso vale anche in caso di carica virale superiore, fino a 10 000 copie/ml, a condizione che la carica virale sembri troppo bassa rispetto al numero delle cellule CD4+.

- Se l'Inno-Lia HIV1-2 Score rileva un'infezione da HIV-2 o del gruppo O di HIV-1, il virus in questione deve essere confermato con il DNA-PCR (indagine presso il CNR; inviare imperativamente il sangue EDTA e non solo il plasma!)
- Nei casi di primoinfezione o di probabile contagio negli ultimi 6 mesi («recent infection») deve essere eseguito un esame delle resistenze in un laboratorio autorizzato.

CONCETTO DI LABORATORIO HIV – RIPARTIZIONE DEI COMPITI NEL CONCETTO DI TEST

La qualità della diagnostica HIV in Svizzera non dipende solo da quale test viene impiegato per rispondere alle diverse domande diagnostiche, ma implica anche una ripartizione dei compiti ragionevole. Esiste pertanto, oltre al concetto tecnico, anche un concetto di laboratorio che regola i requisiti dei laboratori sui tre livelli (laboratori di screening, laboratori di conferma e Centro nazionale per i retrovirus), nonché i rispettivi compiti e obblighi in materia di concetto di test HIV e di sistema di dichiarazione nel settore della sanità pubblica.

Secondo il concetto di laboratorio HIV lo screening è effettuato nei laboratori clinici *riconosciuti* dall'UFSP, inclusi i laboratori di conferma, e in certe situazioni anche negli studi medici, nei consultori diretti da personale medico e negli ospedali. I laboratori di screening trasmettono i prelievi reattivi ai laboratori di conferma riconosciuti dall'UFSP, i quali, oltre alla loro attività di screening, provvedono alla conferma dei prelievi reattivi, all'identificazione dei tipi e dei gruppi secondo i test e gli algoritmi descritti nelle tabelle 4-6 nonché alla dichiarazione anonima di pazienti HIV positivi appena diagnosticati all'UFSP e al medico cantonale. L'accertamento dei casi ancora dubbi e dei casi speciali spetta al CNR, riconosciuto dall'UFSP, che si occupa anche di un'attività limitata di conferma, ma non dello screening (eccetto alcuni casi speciali di diagnostica HIV pediatrica).

Il concetto di laboratorio è stato introdotto per diverse ragioni, tra le quali le più importanti sono la scarsa qualità del test di screening HIV all'inizio della diagnostica HIV rispetto a oggi e la necessità epidemiologica di un accertamento più completo e affidabile possibile delle infezioni HIV da parte dell'UFSP. Questo concetto, all'inizio alquanto controverso, ha preso piede nel corso degli anni e ha dato buoni risultati. I laboratori di conferma e il CNR hanno raccolto molte esperienze che hanno trasmesso anche ai laboratori di screening contribuendo considerevolmente al raggiungimento di un elevato standard della diagnostica HIV in Svizzera.

Gli sviluppi attuali hanno fatto sì che i compiti nei diversi livelli del concetto di laboratorio si ampliassero e in parte venissero scambiati. Se originariamente tutte le conferme venivano eseguite dal CNR con un Western Blot fabbricato dal centro stesso, successivamente i kit di Western Blot ottenibili in commercio hanno reso possibile l'esecuzione di questi testi nei laboratori di conferma. All'inizio le attività di questi ultimi si limitavano alla conferma dei prelievi reattivi al momento dello screening e alla dichiarazione dei pazienti con HIV appena diagnosticati all'UFSP; oggi invece essi devono anche individuare il tipo e il gruppo di HIV e determinare la carica virale. Da marzo 2004 i laboratori diagnostici sono tenuti a eseguire lo screening con test combinati per gli anticorpi HIV-1/2 e l'antigene p24. D'altronde, con l'evoluzione di test rapidi affidabili, lo screening è passato in parte dai laboratori diagnostici agli studi medici. In tutti i livelli del concetto di laboratorio i compiti sono diventati più complessi e i requisiti più rigorosi.

Dichiarazione HIV all'UFSP

La dichiarazione anonima dei risultati positivi viene comunicata all'UFSP solo dopo il test di conferma. I laboratori di conferma sono obbligati, conformemente all'ordinanza sulla dichiarazione, a dichiarare tali risultati all'UFSP e al medico cantonale competente e a inviare al medico committente il «Questionario per le persone con test HIV positivo» nonché l'eventuale materiale informativo supplementare al medico o al paziente. Qualora il materiale d'indagine sia stato inviato da un laboratorio di screening, lo stesso laboratorio ha l'obbligo di trasmettere il questionario o il materiale informativo al medico committente. Inoltre, il nome e l'indirizzo del medico committente devono essere trasmessi al laboratorio di conferma o all'UFSP.

Il sistema di dichiarazione dell'HIV mira a rilevare, possibilmente senza lacune, tutte le diagnosi iniziali delle infezioni HIV. Allo scopo di non falsare la sorveglianza epidemiologica HIV, le dichiarazioni relative ai test ripetuti non devono essere trasmesse. Inoltre, per escludere che una comunicazione di un test venga effettuata più volte, il laboratorio di conferma è tenuto a possedere le strutture informatiche adeguate per eseguire internamente questo controllo. Allo scopo di poter riconoscere due prelievi sanguigni di uno stesso paziente, questi ultimi non devono essere inviati sotto due differenti denominazioni anonime.

Requisiti dei laboratori

Le tabelle 7–9 mostrano i requisiti dei laboratori nei diversi livelli del concetto di laboratorio.

Uno screening HIV può essere eseguito tenendo conto dei requisiti e degli obblighi menzionati nella tabella 7 ai quali il fornitore di prestazioni adempie, in particolare da tutti i laboratori diagnostici nei settori virologia e/o sierologia riconosciuti dall'UFSP e dai laboratori degli studi medici attivi nell'ambito dell'assistenza di base.

Affinché l'UFSP riconosca un'attività di conferma (laboratori di conferma), è indispensabile osservare, oltre i requisiti validi per lo screening HIV, anche i criteri che figurano nella tabella 8. In particolare, deve essere garantito che ogni laboratorio di conferma disponga di infrastrutture, apparecchiature, procedure, ecc. adeguate e di un know-how approfondito in materia di conferma. Il laboratorio deve quindi essere diretto da uno o più titolari FAMH con conoscenze specifiche e formazione permanente documentata nel settore della diagnostica HIV e della valutazione periodica. Al fine di assicurare un lavoro ineccepibile anche nel periodo di prova, i laboratori che intendono intraprendere un'attività come laboratorio di conferma HIV e che soddisfano le condizioni fondamentali ricevono su domanda un riconoscimento per la conferma HIV limitato a due anni. Durante questo periodo, devono dimostrare all'UFSP che sono in grado di eseguire le conferme HIV e soprattutto di attenersi al concetto di test HIV. In questa fase, le loro decisioni indirizzate alla CLD e all'UFSP vengono verificate dal CNR.

Per garantire la qualità richiesta della conferma, un eventuale rinnovo del riconoscimento presuppone di regola un volume di 20 di-

Tabella 6
Combinazione di risultati di test HIV sul primo e sul secondo materiale sufficienti per la conferma di un'infezione HIV. Vale per i laboratori di conferma che eseguono test di conferma solo sul secondo materiale.

Screening (sul primo materiale)	**Test di conferma sul secondo materiale (sangue EDTA ≥ 7 ml, 7–10 giorni dopo)**			
Test combinato HIV-1/2 (anticorpi + antigene p24) della quarta generazione	1° test di conferma		Ulteriori test di conferma necessari	
	Test	Risultato necessario	Test e risultato necessario	Osservazioni
reattivo	Test di screening HIV-1/2 della 3ª o 4ª generazione	reattivo	Line Immunoassay positivo all'HIV-1 HIV-1 RNA ≥1000* copie/ml	Infezione da HIV-1 del gruppo M
			Line Immunoassay positivo all'HIV-2 HIV-2 DNA PCR positivo (test presso il CNR)	Infezione da HIV-2: determinazione alternativa della carica virale presso il CNR
	Line Immunoassay HIV-1/2	HIV positivo/HIV-1	HIV-1 RNA ≥1000* copie/ml	Infezione da HIV-1 del gruppo M
		HIV positivo/HIV-2	HIV-2 DNA PCR positivo (test presso il CNR)	Infezione da HIV-2: determinazione alternativa della carica virale presso il CNR
		HIV positivo/HIV-1; con o senza sospetto sierologico di gruppo O	HIV-1 RNA (Roche) non evidenziabile HIV-1 RNA o HIV-1 DNA positivo con Primers/Probes che riconoscono l'HIV-1 del gruppo O. Analisi della sequenza nel gene gag (test presso il CNR)	Infezione da HIV-1 del gruppo O: determinazione alternativa della carica virale presso il CNR
	Test dell'antigene p24	reattivo e neutralizzazione positiva	HIV-1 RNA ≥1000* copie/ml Line Immunoassay positivo all'HIV-1 (aspettare la sieroconversione!)	Infezione da HIV-1 del gruppo M
			Line Immunoassay positivo all'HIV-2 (aspettare la sieroconversione!) HIV-2 DNA PCR positivo (test presso il CNR)	Infezione da HIV-2: determinazione alternativa della carica virale presso il CNR

* in caso di HIV-1 RNA evidenziabile in una concentrazione inferiore a 1000 copie/ml esiste il sospetto di una variante mal individuata con la RT-PCR: in questo caso la carica virale deve essere verificata con il PERT Assay dal CNR. Lo stesso vale anche in caso di carica virale superiore, fino a 10 000 copie/ml, a condizione che la carica virale sembri troppo bassa rispetto al numero delle cellule CD4+.
- Se l'Inno-Lia HIV1-2 Score rileva un'infezione da HIV-2 o del gruppo O di HIV-1, il virus in questione deve essere confermato con il DNA-PCR (indagine presso il CNR; inviare imperativamente il sangue EDTA e non solo il plasma!)
- Nei casi di primoinfezione o di probabile contagio negli ultimi 6 mesi («recent infection») un esame delle resistenze deve essere eseguito in un laboratorio autorizzato.

chiarazioni HIV all'anno indirizzate all'UFSP. Questo si applica sia ai nuovi laboratori di conferma HIV che a quelli già affermati. Qualora questi non raggiungessero il volume richiesto, l'UFSP esamina se la qualità della conferma HIV è ancora garantita, prima che il riconoscimento come laboratorio di conferma venga rinnovato.

Quale misura ulteriore per assicurare la qualità necessaria per l'attività di conferma, tutti i laboratori in questione indicano i loro algoritmi e i kit impiegati sull'intranet della CLD tenendoli costantemente aggiornati. Questi algoritmi devono garantire che si possa distinguere nel modo più efficace ed economico possibile tra i virus del gruppo M dell'HIV-1 e i virus non-M (gruppo O dell'HIV-1, HIV-2), affinché i casi con virus non-M possano essere inviati al CNR per conferma e determinazione della carica virale. Inoltre, devono essere identificate e inviate per conferma al CNR anche le varianti del virus del gruppo M che sono mal riconosciute con i metodi correnti RT-PCR (potenzialmente i pazienti con meno di 1'000 copie HIV-1 RNA per millilitro). Per quanto concerne tutti i test utilizzati nello screening, nella conferma e nel monitoring dell'HIV, i laboratori di conferma partecipano a controlli esterni sulla qualità, a condizione che siano disponibili, e inseriscono le relative informazioni nell'intranet della CLD e le tengono aggiornate.

I laboratori di conferma eseguono i test utilizzati per l'analitica di conferma almeno 1 volta alla settimana, trasmettono i casi con sospetto di infezioni non-M al CNR, allestiscono le dichiarazioni HIV all'UFSP e al medico cantonale e inviano i questionari, il materiale informativo e al-

tri documenti al medico curante o al paziente, e per di più sono attivi nella CLD e collaborano con l'UFSP.

I requisiti e gli obblighi del Centro nazionale per i retrovirus (livello di conferma II) figurano nella tabella 9. Contrariamente ai laboratori di conferma, il CNR è nominato dall'UFSP e deve adempiere a un mandato di prestazioni specifico diretto dell'UFSP, periodicamente controllato e adattato. Oltre a soddisfare questo mandato di prestazioni e i requisiti e gli obblighi validi per i laboratori di conferma, il CNR deve disporre di metodi sensibili e specifici per il riconoscimento e la tipizzazione di tutti i ceppi HIV esistenti, anche di quelli anomali, e per la quantificazione corretta degli stessi. Fornisce anche consigli ai laboratori di conferma e monitorizza quelli appena riconosciuti per i primi due anni.

Dato che lo screening e le conferme di routine non fanno parte dei compiti del CNR e i casi confermati dal Centro che appartengono al livello di conferma II sono dichiarati dai laboratori di conferma, il CNR è dispensato sia dall'esigenza di almeno 20 dichiarazioni HIV all'anno da inviare all'UFSP sia dall'esigenza di una frequenza settimanale del procedimento analitico.

Collaborazione tra i diversi livelli e responsabilità

Per garantire la qualità del processo di conferma, è indispensabile anche un'ottima collaborazione tra gli attori dei diversi livelli. È essenziale quindi che i laboratori di screening mettano a disposizione dei laboratori di conferma il materiale d'indagine appropriato in quantità sufficienti come anche i dati clinici disponibili, le domande rilevanti e i risultati dei test HIV eseguiti nei loro laboratori. Devono ugualmente fornire il nome e l'indirizzo del medico curante committente, poiché questa informazione è necessaria per la dichiarazione all'UFSP. Dato che la responsabilità delle indagini di conferma spetta esclusivamente al laboratorio di conferma, questo decide a sua discrezione quali test necessita per adempiere al mandato di conferma nell'ambito del concetto di test HIV nel modo più sicuro e soddisfacente, ma anche più economico. Un mandato per una conferma HIV non è quindi semplicemente il compito di eseguire un determinato test e tralasciare gli altri; si tratta piuttosto

Tabella 7
Concetto di laboratorio: obiettivo del livello, requisiti e obblighi nonché metodi per i laboratori di screening

Obiettivo del livello:	**Lo screening HIV rileva selettivamente tutti i soggetti infetti da HIV-1 o HIV-2**
Fornitore delle prestazioni	**Laboratorio clinico**
Requisiti e obblighi	• È riconosciuto dall'UFSP come laboratorio microbiologico e sierologico • È sempre disponibile personale qualificato per l'esecuzione e l'interpretazione dei test • Impiega solo test HIV certificati CE • Osserva le raccomandazioni della Commissione peritale laboratorio e diagnostica HIV/AIDS (CLD) dell'UFSP • Partecipa regolarmente agli esperimenti collettivi nazionali e/o internazionali sul controllo della qualità • In caso di risultati reattivi provvede a spedire il materiale d'indagine idoneo in quantità sufficienti a un laboratorio di conferma • Spedisce, oltre al materiale d'indagine, anche i dati clinici disponibili, le domande rilevanti e i risultati degli screening HIV-1/2 al laboratorio di conferma • Inoltra i risultati ottenuti dal laboratorio di conferma, i formulari di dichiarazione e il materiale informativo al medico curante • Comunica al laboratorio di conferma il nome e l'indirizzo del medico curante per la dichiarazione di un paziente HIV positivo appena diagnosticato
Metodi	• Utilizza un test combinato HIV-1/2 (anticorpi + antigene p24) della quarta generazione certificato CE
Fornitore delle prestazioni	**Studio medico** **Consultori o centri diretti da personale medico che eseguono test HIV anonimi e prelievi del sangue** **Ospedale (ad esempio, per la diagnosi rapida del paziente originario con ferite da puntura per la profilassi post-esposizione)**
Requisiti e obblighi	• Soddisfa il criterio QUALAB • è sempre disponibile del personale qualificato per l'esecuzione e l'interpretazione dei test • Impiega solo test HIV certificati CE • Osserva le raccomandazioni della Commissione peritale laboratorio e diagnostica HIV/AIDS (CLD) dell'UFSP • Partecipa regolarmente agli esperimenti collettivi nazionali e/o internazionali sul controllo della qualità • In caso di sospetto di primoinfezione HIV invia il materiale d'indagine a un laboratorio di conferma • In caso di risultati reattivi del test spedisce il materiale d'indagine idoneo in quantità sufficienti a un laboratorio di conferma • Spedisce, oltre al materiale d'indagine, anche i dati clinici rilevanti, le domande rilevanti e i risultati dei test rapidi HIV-1/2 al laboratorio di conferma
Metodi	• Utilizza un test rapido HIV-1/2 certificato CE

di un mandato globale volto a rispondere alle tre domande centrali che si pongono durante la nuova diagnosi di un'infezione HIV (cfr. la sezione Concetto tecnico e la tabella 1).

Affinché si possano raccogliere le informazioni necessarie a rispondere alle tre domande in modo completo, il primo e il secondo materiale di un paziente vanno spediti imperativamente allo stesso laboratorio di conferma.

LA COMMISSIONE PERITALE LABORATORIO E DIAGNOSTICA HIV/AIDS DELL'UFSP (CLD)

Oltre ai laboratori in quanto fornitori di prestazioni essenziali, la Commissione peritale laboratorio e diagnostica HIV/AIDS dell'UFSP, abbreviata CLD, riveste un'importanza decisiva per la qualità della diagnostica HIV in Svizzera. La CLD, nata nel 2000 dalla precedente Sottocommissione immunologia e virologia della CFPA, è composta dai responsabili dei laboratori di conferma e del Centro nazionale per i retrovirus nonché dai rappresentanti dell'UFSP e di Swissmedic che si occupano specificamente dell'epidemiologia HIV, rispettivamente dell'esame e della registrazione dei test HIV commerciali. Numerosi membri della CLD sono inoltre attivi nel Swiss HIV Cohort Study (SHCS) e nella ricerca nell'ambito dell'HIV e di altri retrovirus. Questa Commissione raggruppa dunque sia le conoscenze specifiche in materia di HIV che quelle in diagnostica generale, e rappresenta così uno strumento ideale per l'interpretazione dei problemi legati alla diagnostica HIV e per la ricerca di soluzioni ottimali.

Il compito principale della CLD, in qualità di commissione peritale dell'UFSP, è l'elaborazione di direttive e raccomandazioni che garantiscono l'alta qualità della diagnostica HIV, migliorandola continuamente. Questo concerne da una parte l'aggiornamento costante del concetto tecnico e dall'altra le eventuali modifiche al concetto di laboratorio. Altri compiti importanti sono la promozione del networking e della collaborazione tra i laboratori di conferma nonché tra questi e il CNR mediante sedute periodiche e progetti co-

Tabella 8
Concetto di laboratorio: obiettivo del livello, requisiti e obblighi nonché metodi per i laboratori di conferma (livello di conferma I)

Obiettivi del livello:	• **Conferma di un'infezione HIV come base centrale per porre la diagnosi HIV da parte del medico curante** • **Riconosce i casi sospetti di ceppi HIV anomali che sono mal rilevati dagli attuali metodi di misura per l'HIV-RNA (HIV-2, HIV-1 gruppo O, ecc.) e inoltra tali casi al CNR** • **Determinazione della carica virale in caso di HIV-1 del gruppo M** • **Dichiarazione dell'infezione e dei tipi di HIV alle autorità sanitarie** • **Collaborazione in seno alla CLD e partecipazione attiva ai suoi progetti comuni** • **Collaborazione con l'UFSP**

Fornitore delle prestazioni	**Laboratorio di conferma (è anche laboratorio di screening)**
Requisiti e obblighi	Come laboratorio di screening Inoltre • è riconosciuto dall'UFSP come laboratorio microbiologico e sierologico e laboratorio di conferma • il primo riconoscimento è limitato a due anni. Durante questo periodo tutte le conferme HIV sono presentate al CNR per verifica. Se sono presentate meno di 20 infezioni HIV confermate all'anno, si deve esaminare se la qualità della conferma HIV è ancora garantita, prima che il riconoscimento venga rinnovato. • il numero di 20 casi annui confermati HIV positivi vale sia per i laboratori di conferma nuovi che per quelli già affermati. Se sono presentate meno di 20 infezioni HIV confermate all'anno, si deve esaminare se la qualità della conferma HIV è ancora garantita, prima che il riconoscimento venga rinnovato. • il laboratorio deve essere diretto da uno o più titolari FAMH con conoscenze specifiche e formazione permanente documentata nel settore della diagnostica HIV e della valutazione continua. • le condizioni adeguate (locali, personale, logistica e procedimenti) per eseguire i test dell'amplificazione dell'acido nucleico sono soddisfatte • carica l'algoritmo di conferma impiegato e i test utilizzati a tal proposito sull'Intranet della CLD e mantiene questa informazione aggiornata • partecipa in modo esauriente ai controlli della qualità esterni di tutti i test impiegati per lo screening HIV, la conferma e il monitoring. Carica e aggiorna tutte le informazioni rilevanti dei centri di controllo della qualità, i risultati, il grado di adempimento sull'Intranet della CLD. • la frequenza minima delle analisi impiegate per la conferma HIV è pari a una volta alla settimana • inoltra i casi sospetti di ceppi HIV anomali al CNR • dichiarazione HIV al medico cantonale e all'UFSP • collaborazione attiva in seno alla CLD e ai suoi progetti in corso • collaborazione con l'UFSP
Metodi	• Come laboratorio di screening; ulteriori test che soddisfano i requisiti per la conferma HIV secondo le tabelle 6 e 7. In particolare: • Secondo test di screening certificato CE • Line Immunoassay certificato CE • Messa in evidenza dell'acido nucleico e dell'HIV-RNA con metodi standard commerciali certificati CE

Tabella 9
Concetto di laboratorio: obiettivo del livello, requisiti e obblighi nonché metodi per il CNR (livello di conferma II)

Obiettivi del livello:	**• Conferma o esclusione di un'infezione HIV anche in casi complicati** **• Identificazione di ceppi HIV anomali** **• Misurazione adeguata della carica virale anche in caso di ceppi HIV anomali** **• Soluzione di altre domande speciali** **• Dichiarazione dell'infezione e dei tipi di HIV alle autorità sanitarie** **• Collaborazione in seno alla CLD e partecipazione attiva ai suoi progetti comuni** **• Collaborazione con l'UFSP**

Fornitore delle prestazioni	**Centro nazionale svizzero per i retrovirus**
Requisiti	Come laboratorio di conferma (senza lo screening)* Inoltre • nominato dall'UFSP quale *Centro nazionale svizzero per i retrovirus* • soddisfa le direttive specifiche del mandato di prestazioni dell'UFSP
Metodi disponibili	• Metodi sensibili e specifici sierologici che fanno uso della biologia molecolare per il riconoscimento e la tipizzazione di tutti i ceppi HIV (comprende anche i metodi senza certificazione CE) • Quantificazione dei ceppi HIV che non possono essere quantificati con le procedure standard (comprende anche metodi senza certificazione CE)
Obblighi	• Dichiarazione HIV al medico cantonale e all'UFSP • Consulenza ai laboratori di conferma • Monitoring dei laboratori di conferma che hanno ottenuto da poco il riconoscimento • Collaborazione attiva in seno alla CLD e ai suoi progetti in corso • Collaborazione con l'UFSP

* le cifre annue minime per le conferme non si applicano, poiché uno screening e le conferme di routine da cui risultano non sono compiti principali del CNR e i casi confermati dal CNR stesso sono dichiarati dai laboratori di conferma.

muni, il miglioramento del flusso di informazioni rilevanti destinate all'UFSP, alla Commissione peritale clinica e terapia di HIV/AIDS (CCT) e alla CFPA nonché il suo contributo con conoscenze diagnostiche in queste commissioni. La CLD consiglia l'UFSP in particolare nel riconoscimento di laboratori di conferma, i cui responsabili, diventando membri della CLD, si impegnano a contribuire alle attività della Commissione.

Membri della CLD

Sig.a Dr ès sc C. Andreutti (Losanna), Dr. Ph. Bürgisser (Losanna), Dr. phil. R. Dubs (Zurigo), Sig.a Dr. med. I. Steffen (Basilea), Dr. phil II M. Gebhardt (UFSP Berna), Sig.a Dr. med. M. Gorgievski (Berna), Dr. B. Güntert (Lucerna), Sig.a Dr. G. Martinetti (Bellinzona), PD Dr. med. L. Matter (Basilea), Dr. phil. nat. Chr. Niederhauser (Berna), Sig.a Dr S. Yerly (Ginevra), Dr. A. Schlegel (Swissmedic Berna), Dr. med. dipl. biol. D. Schultze (San Gallo), Prof. Dr. med. J. Schüpbach (CNR Zurigo; presidente). ■

Ufficio federale della sanità pubblica
Unità di direzione sanità pubblica
Divisione malattie trasmissibili
Sezione mallattie infettive
Telefono 031 323 87 06

Bibliografia

1. Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. *http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines/adult/AA_032304.pdf*, 2004.
2. Plantier JC, Gueudin M, Damond F, Braun J, Mauclere P, Simon F. Plasma RNA quantification and HIV-1 divergent strains. J Acquir Immune Defic Syndr 2003; 33: 1–7.
3. Katsoulidou A, Petrodaskalaki M, Sypsa V, et al. Evaluation of the clinical sensitivity for the quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Comparison of the new COBAS TaqMan HIV-1 with three current HIV-RNA assays-LCx HIV RNA quantitative, VERSANT HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) and COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor v1.5. J Virol Methods 2005.
4. Boni J, Shah C, Flepp M, Luthy R, Schupbach J. Detection of low copy numbers of HIV-1 proviral DNA in patient PBMCs by a high-input, sequence-capture PCR (Mega-PCR). J Med Virol 2004; 72: 1–9.
5. Swanson P, de Mendoza C, Joshi Y, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and Nucli-Sens HIV-1 QT. J Clin Microbiol 2005; 43: 3860–8.
6. Schutten M, van der Ende ME, Niesters HGM, Osterhaus ADME. Cross-reactivity of the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Version 1.5 Quantitative Plasma HIV-1 RNA Assay with HIV-2. Abstract Nr. 959. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, CA, 2004.