

della Clinica Mangiagalli della Fondazione Policlinico, Ma.Re, al fine di valutare la suscettibilità al virus VZV in età fertile.

Metodi. La ricerca di IgG anti VZV è stata condotta con il kit Liaison VZV IgG Diasorin (Saluggia).

Risultati. Dei 382 campioni saggiati, 28 pari al 7.3% sono risultati negativi.

È interessante notare, tuttavia, che la percentuale di suscettibilità al VZV è pari al 6.8% tra le puerpere di origine italiana e pari al 9.7% tra le puerpere di origine extracomunitaria. Valutando la presenza di anticorpi anti VZV in base all'anno di nascita è possibile evidenziare un incremento della suscettibilità nelle classi di età più giovane.

Conclusioni. Questi dati preliminari sembrano supportare l'importanza di un'eventuale offerta vaccinale in età adolescenziale o alle donne suscettibili in età fertile per scongiurare il rischio delle complicanze materno-fetali dovute alla varicella in gravidanza.

128

VALUTAZIONE DI DUE TEST REAL-TIME-PCR PER CMV-DNA ASSOCIATI AD ESTRAZIONE AUTOMATICA DEL DNA DA SANGUE INTERO

Varetto S.; Pittaluga F.; Giliberto G.; Mantelli S.; Cerutti F.; Alice T.; Ghisetti V.

S.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino, c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

Introduzione. La terapia precoce ed il monitoraggio dell'infezione da CMV ha permesso di diminuirne la morbilità e la gravità. I recenti metodi di real-time-PCR offrono una quantizzazione in tempi rapidi con range dinamico più ampio dei tradizionali metodi end-point. Manca però una standardizzazione della matrice biologica di partenza e del metodo di estrazione del DNA.

Lo scopo del lavoro è stato di confrontare due sistemi basati sulla tecnologia real-time-PCR (Artus, Qiagen, Mi, CMV-Q, Nanogen, To) per CMV-DNA entrambi applicati a sangue intero (200 ul) mediante estrazione completamente automatizzata condotta su BioRobot MDx (Qiagen, Mi).

Metodi. Un gruppo di 37 campioni di sangue intero provenienti da un gruppo più ampio di 397 campioni da 48 pazienti con infezione asintomatica da CMV. In precedenza già analizzati per CMV DNA con real-time-PCR Q-CMV-Nanogen e pp65-antigenemia, sono stati analizzati con il metodo Artus-Qiagen. Un pannello di proficiency (0, 500, 5000, 50000, 500000 copie/ml di CMV-DNA, Acrometrix, US) è stato usato per valutare sensibilità e riproducibilità dei test.

Risultati. Con il pannello di proficiency la correlazione tra valori attesi e osservati è stata ottima per entrambi i kit ($r=0,999$) con sensibilità migliore per il Kit-Qiagen rispetto a quello Nanogen (100% e 50% alla concentrazione 500 copie/ml, rispettivamente, CV% inter-assay su tutti gli standard <60% e <40%). Per valori di antigenemia corrispondenti a 0, 1-10, 11-20, 21-50, e ≥ 51 cellule pp65 positive /200.000 leucociti, la mediana dei valori di CMV-DNA ottenuti con il kit-Qiagen è stata di 3,3; 3,5; 4,6; e 5,5 \log_{10}/ml (kit-Nanogen: 3,7; 3,9; 4,6 e 5,6). La correlazione tra i 2 test è stata di 0,955.

Conclusione. La determinazione di CMV-DNA da sangue

intero mediante i due sistemi commerciali di real-time PCR è risultata riproducibile e sensibile, con un'ottima correlazione, semplificando e accelerando il processo di quantizzazione di CMV-DNA per scopi clinico-terapeutici.

129

USO DEL TEST DI GENOTIPIZZAZIONE IN PAZIENTI HBV-DNA POSITIVI IN FALLIMENTO TERAPEUTICO

Caligiuri P., Buzzone B., Ventura A., Riccio C., Maglio A., Icardi G.

Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Genova

Introduzione. In Italia i farmaci approvati per il trattamento dell'epatite B cronica sono l'interferone alfa (IFN- α), due analoghi nucleosidici sintetici Lamivudina e Entecavir e un analogo nucleotidico sintetico, l'Adefovir Dipivoxil; altri farmaci sono ancora in fase di sperimentazione clinica. La risposta all'interferone è inferiore al 40% ed associata a diversi effetti collaterali, mentre la monoterapia con gli antivirali determina a lungo termine farmaco-resistenza. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare la prevalenza delle mutazioni associate a resistenza in pazienti HBV-DNA positivi in fallimento terapeutico.

Metodi. Nel nostro studio sono stati arruolati 54 pazienti, 49/54 trattati con Lamivudina e 5/54 in terapia combinata con Lamivudina ed Adefovir. Tutti i campioni sono stati sequenziati con il kit Trugene HBV Genotyping (Bayer-HealthCare), capace di identificare le mutazioni, localizzate nei domini B, C (YMDD) e D della regione POL/RT, che conferiscono resistenza ai tre farmaci antivirali.

Risultati. 34/54 (63%) sequenze analizzate presentavano mutazioni conferenti resistenza alla Lamivudina, di queste 15/34 (44%) la mutazione M204V/I, 15/34 (44%) la M204V e la L180M e infine 4/34 (12%) le mutazioni V173L, M204V e L180M. Solo 1 paziente tra i cinque trattati con 3TC e ADF ha sviluppato oltre alle mutazioni V173L, M204V e L180M, la mutazione L181V/T, che conferisce resistenza all'Adefovir.

Il genotipo D (47/54-87%) è risultato quello prevalente, seguito dal genotipo A (4/54-7.4%), E (1/54-1.86%), G (1/54-1.86%) ed F (1/54-1.86%)

Conclusioni. I risultati ottenuti mostrano che durante il trattamento dell'infezione cronica da HBV con i farmaci attualmente disponibili, si assiste, inevitabilmente alla comparsa di mutazioni farmaco-resistenti come avviene nell'infezione da HIV. Risulta quindi importante la disponibilità, nei pazienti in fallimento virologico, di nuove molecole in grado di inibire la replicazione virale dei ceppi resistenti ai farmaci finora disponibili. Inoltre, diventa indispensabile continuare a monitorare la comparsa di nuove mutazioni attraverso l'uso della genotipizzazione virale.