

202

CONFRONTO TRA DUE SAGGI DI REAL-TIME PCR ED UNA NESTED PCR PER LA DIAGNOSI DI TOXOPLASMOSSI

Calderaro A., Piccolo G., Peruzzi S., Gorrini C., Bommezzadri S., Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio,
Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma.

Introduzione. In questo studio sono stati valutati due saggi di Real-time PCR ed un saggio di nested PCR per la diagnosi molecolare di toxoplasmosi da applicare nei casi dove la diagnosi sierologica potrebbe essere di difficile interpretazione.

Metodi. Campioni biologici sperimentalmente addizionati di tachizoiti di *T.gondii* coltivati in cellule VERO e opportunamente diluiti, sono stati utilizzati per valutare la sensibilità di due Real-time PCR ("TaqMan" e "FRET") e di una nested PCR, aventi come bersaglio una regione di 529 pb, ed i geni 18S RNA e B1 di *T.gondii*, rispettivamente.

La specificità è stata valutata sottoponendo agli stessi saggi DNA di *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Leishmania infantum*.

Sono stati anche saggiati mediante nested-PCR 46 campioni biologici (16 liquidi amniotici, 13 campioni di sangue, 7 liquor, 7 biopsie tissutali e una da linfonodo e 2 campioni di umor vitreo) di donne gravide o pazienti immunodepressi con sospetta infezione da *T.gondii*.

Risultati. La sensibilità analitica è risultata 10^3 tachizoiti/ml (nested e Real-time PCR "TaqMan") e 10^2 tachizoiti/ml ("FRET"). Nessun segnale di PCR è stato osservato saggiando il DNA di *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Leishmania infantum*.

Tre dei 46 campioni esaminati (2 liquor, 1 biopsia cerebrale) sono risultati positivi per la presenza del DNA di *T.gondii*.

Conclusioni. I saggi di PCR valutati sono sensibili e specifici; in particolare, la FRET-PCR è risultata la più sensibile, probabilmente a causa del maggior numero di copie della sequenza bersaglio presenti nel DNA di *T.gondii*.

I saggi di Real-time PCR sono di semplice esecuzione e forniscono risultati in tempi più brevi rispetto ai sistemi convenzionali di PCR, riducendo anche il rischio di contaminazione, rendendone così utile l'applicazione in campo diagnostico soprattutto nella nostra realtà in cui nel 2005 la prevalenza dell'infezione da *Toxoplasma gondii* rilevata su sieri di 3.997 soggetti è stata del 31.57%.

203

REAL-TIME-PCR PER LA QUANTIZZAZIONE DI CMV-DNA DA SANGUE INTERO NEL FOLLOW-UP DI PAZIENTI TRAPIANTATI

Varetto S.; Pittaluga F.; Giliberto G.; Martelli S.; Gabella S.; Alice T.; Ghisetti V.; Marchiaro G.

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

Introduzione. Nel trapianto d'organo, il monitoraggio dell'infezione da CMV mediante la ricerca dell'antigene pp65 è

il gold-standard per la diagnosi e il trattamento precoce dell'infezione che si associa, in molte realtà di laboratorio, alla determinazione del CMV-DNA che è più precoce. I recenti metodi di Real-Time-PCR offrono una quantizzazione in tempi rapidi e range dinamico più ampio dei tradizionali metodi end-point, ma manca ancora una standardizzazione della matrice biologica di partenza e dell'estrazione del DNA. Lo scopo del lavoro è stato di valutare e confrontare con l'antigenemia un sistema Real-Time-PCR (AmpliMedical, To) per CMV-DNA applicato a sangue intero (200 ul) mediante estrazione completamente automatizzata basata su tecnologia dell'affinità degli acidi nucleici per gel di silice (Qiagen, Mi).

Metodi. Sono stati analizzati 388 campioni per CMV-DNA e pp65-antigenemia, provenienti da 128 pazienti (100 con infezione CMV, di cui 28 in trattamento pre-emptive, 72 non trattati, e 28 senza infezione) sottoposti a trapianto d'organo solido e di midollo

Risultati. La correlazione tra Real-Time-PCR e antigenemia è stata buona ($r=0,648$). Per valori di antigenemia corrispondenti a 0, da 1 a 10, da 11 a 20, da 21 a 50, da 51 a 100 e > 100 cellule pp65 positive /200.000 leucociti, la mediana dei valori di CMV-DNA è stata rispettivamente di 3,3; 3,9; 4,5; 4,6; 5,0 e 5,9 \log_{10} /ml. Un plasmide (Clonit, MI.) recante la regione amplificata IE a concentrazione nota è stato usato per testare la sensibilità (100% alla concentrazione di 100 copie in amplificazione e 100% per 5000 copie in estrazione) e la riproducibilità del sistema di estrazione e amplificazione (CV tra serie <19%). La percentuale di inibizione è stata del 2%.

Conclusioni. La determinazione di CMV-DNA da sangue intero mediante Real-Time-PCR è risultata altamente riproducibile e sensibile, semplificando e accelerando il processo di quantizzazione di CMV-DNA per scopi clinico-terapeutici.

204

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI INSORGENZA DI NEFROPATIA ASSOCIATA A POLYOMAVIRUS NELLO SCREENING DI TRAPIANTATI RENALI

Cricca M.^{1,2}, Venturoli S.¹, Ambretti S.¹, Gentilomi G.¹, Liviano D'Arcangelo G.³, Capelli I.³, Scolari M.P.³, Musiani M.¹, Zerbini M.¹

¹D.M.C.S.S. - Divisione di Microbiologia, Università di Bologna,

²C.R.E.M.M. - Azienda Ospedaliera S.Orsola Malpighi; Via Massarenti 9, 40138 Bologna

³Unità Operativa di Nefrologia Dialisi e Trapianto - Azienda Ospedaliera S.Orsola Malpighi; Via Massarenti 9, 40138 Bologna

Introduzione. La nefropatia da polyomavirus (PVAN) è una patologia emergente nei trapiantati renali caratterizzata da malfunzionamento e perdita d'organo nell'8% dei casi. L'associazione con la nefropatia è dimostrata per BKV, mentre è ancora da dimostrare per JCV. Attualmente la presenza di una elevata carica di DNA di BKV nelle urine e soprattutto nel plasma di trapiantati di rene è considerata predittiva dell'insorgenza di PVAN.

In questo studio abbiamo messo a punto un saggio di PCR quantitativa per la ricerca di BKV e JCV in urina e plasma di trapiantati renali allo scopo di modulare la terapia antirigetto e ridurre così il rischio di insorgenza di PVAN.

Metodi. È stato allestito un saggio di Real Time PCR per la

contemporanea amplificazione e tipizzazione di BKV e JCV utilizzando lo strumento Rotor-Gene e sonde TaqMan. Inoltre è stato inserito un bersaglio sintetico (EC01) a concentrazione nota a monte del processo di estrazione e la resa dell'estrazione è stata ottenuta quantificando l'EC01 estratto. In 89 trapiantati renali è stata valutata, a tempo 0 e nel follow-up post trapianto, la carica del DNA di BKV e JCV nell'urina e plasma. I pazienti sono stati poi suddivisi in gruppi di rischio in base alla positività a BKV e/o JCV su plasma e/o urina.

Risultati. Degli 89 pazienti seguiti, 13 (14,6%) hanno presentato, tra 6 e 12 mesi post trapianto, una viruria da BKV e/o JCV significativamente elevata ($>10^7$ copie/ml), suggestiva di possibile interessamento renale. Dei 13 pazienti, 6 hanno mostrato riattivazione da BKV, 6 da JCV e uno da entrambi i virus. Valutando la viremia, 3 dei 6 pazienti con infezione da BKV hanno mostrato valori significativi ($\geq 10^5$ copie/ml) mentre nessuno dei 6 pazienti con riattivazione da JCV ha mostrato valori di viremia significativi. Il paziente con riattivazione di entrambi i virus ha mostrato, a un anno dal trapianto, una viruria di $7,64 \times 10^9$ copie/ml e una viremia da BKV di $1,22 \times 10^6$ copie/ml. Nei successivi follow-up si è registrato un aumento della viremia ed un peggioramento dei parametri chimico-clinici (creatinina >2 mg/dl); sulla base di questi dati si è deciso di ridurre la terapia immunosoppressiva. A 3 mesi dalla riduzione della terapia i valori di viremia sono risultati ridotti di 2 logaritmi ($1,40 \times 10^4$ copie/ml).

Conclusione. Il saggio di Real time PCR TaqMan per lo screening di BKV e JCV in trapiantati renali si è rivelato utile nel valutare il rischio di insorgenza di PVAN e nel monitoraggio della fitness virale in seguito a riduzione della terapia. Resta ancora da valutare il significato clinico dell'infezione da JCV.

- redazione, verifica ed emissione di nuova documentazione conforme alla norma.

Gli obiettivi educativi erano rivolti a sviluppare capacità di:

- individuare responsabilità specifiche e definite
- dichiarare regole conformi e condivise
- produrre evidenze oggettive a fronte delle regole
- analizzare criticamente il proprio modo di operare alla luce di quanto prescritto dalla norma.

Il corso di FSC è stato progettato e proposto dal direttore di U.O. e dal responsabile scientifico al Servizio Formazione dell'Azienda per i Servizi Sanitari della provincia di Trento che, dopo valutazione in commissione provider, ha provveduto all'accreditamento. Nel settore di batteriologia sono stati coinvolti 4 dirigenti, il coordinatore tecnico e 11 tecnici di laboratorio. Il programma è stato articolato in 7 fasi da svolgere nell'arco di due mesi con un impegno preventivato di 20 ore a partecipante più un periodo di collaudo della documentazione sul campo della durata di un mese. Il corso prevedeva lo studio della documentazione dipartimentale, delle Istruzioni Operative (I.O.) in uso, seguito da un confronto della documentazione esistente con la norma tramite l'uso di una lista di riscontro e la rilevazione delle non conformità. L'attività era organizzata con due incontri in plenaria, studio individuale della documentazione e lavori a piccoli gruppi coordinati da due tutor con conoscenze specifiche nella gestione della qualità. Sono state elaborate 11 I.O. relative all'area della batteriologia. La FSC si è confermata una valida metodologia formativa che favorisce l'acquisizione di una mentalità aperta all'evidenza, alla collaborazione e alla ricerca continua di opportunità di miglioramento.

205

SISTEMA QUALITÀ E FORMAZIONE SUL CAMPO: ESPERIENZA DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA DI TRENTO

Adamo T., Amari A., Bandera M., Caciagli P., Cainelli M., Caola I., Devitis A., Fedrizzi M., Filippi S., Menghini L., Ober P., Pederzoli L., Perfetti I., Rigoni A., Sartori R., Simione M.B., Trenti M.

U.O. Microbiologia e Virologia, Ospedale di Trento

Nella U.O. Microbiologia e Virologia dell'Ospedale di Trento si sta implementando il sistema qualità ISO15189:2003, con una sequenzialità stabilita a livello dipartimentale. Per coinvolgere nel miglioramento il personale dell'U.O. è stato progettato e realizzato nel 2005 un corso di formazione sul campo (FSC) dal titolo: "Il miglioramento continuo della qualità: revisione della documentazione della fase analitica secondo i requisiti della norma ISO 15189". Gli obiettivi generali della formazione erano:

- conoscenza della norma
- individuazione di aree di miglioramento delle procedure analitiche esistenti; adeguamento alle più recenti evidenze scientifiche, a quanto dichiarato nel Manuale della Qualità, nelle procedure generali dipartimentali e ai requisiti della norma