
STUDIO EPIDEMIOLOGICO E OTTIMIZZAZIONE DI REAL-TIME PCR PER L'IDENTIFICAZIONE DI ADENOVIRUS IN CAMPIONI CLINICI.

La Rosa¹ G., Muscillo¹ M, Di Grazia¹ A., Fontana¹ S., De Carolis² E., Sali² M, Manzara² S. and Fadda² G.

¹ Istituto Superiore di Sanità, Roma.

² Policlinico A. Gemelli, Università Cattolica "S. Cuore", Roma.

Introduzione. Gli Adenovirus sono un gruppo estremamente eterogeneo e diffuso di virus, spesso associati ad epidemie influenzali. In Italia non esistono dati sulla loro circolazione nell'uomo né sono stati proposti metodi per la loro determinazione qualitativa e quantitativa.

Metodi. In questo lavoro, una collezione di 103 isolati clinici proveniente dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma costituita da tamponi fecali (71%), faringei (25%), liquor (1%), urine (2%) e materiale biotico (1%) inoculati su cellule Vero o Hep2, è stata inizialmente identificata mediante immunofluorescenza. Successivamente i DNA estratti da lisati cellulari sono stati amplificati mediante PCR avente come target il gene "hexon". L'analisi delle sequenze degli amplificati ha rivelato che tutte le specie da A ad F sono presenti in Italia e che la specie C ha una prevalenza del 77% con i sierotipi 2 (53,4%), 1 (15,6%) e 6 (8,7%).

L'amplicone del sierotipo 2 è stato clonato in plasmide pCR4-TOPO e lo stock plasmidico utilizzato per la calibrazione di una RealTime PCR.

Una curva di calibrazione è stata ottenuta con diluizioni scalari in base 10 di uno stock contenente 25 picogrammi/ml (4.46×10^9 genome/ml) di plasmide. Una seconda curva di calibrazione è stata ottenuta con diluizioni scalari di adenovirus 2 da $1,22 \times 10^{-2}$ a $5,59$ CCID₅₀/ml. Il segnale fluorescente, ottenuto con lo stesso probe su tutti i sierotipi della collezione, è stato determinato usando il metodo TaqMan ed apparecchiatura ABI7000.

Risultati. Il doppio sistema di calibrazione ha permesso di stabilire un rapporto medio genomi/particelle infettanti pari a $8,12 \times 10^5$. Questo parametro ha permesso di dedurre che la concentrazione delle particelle infettanti nei campioni di lisati originari variava da 10 a 10^3 CCID₅₀/ml e che la soglia di sensibilità del metodo è di 10^{-4} - 10^{-5} CCID₅₀/ml. Come controlli positivi sono stati utilizzate soluzioni titolate di Adenovirus 40 e 41 dell'ATCC.

Conclusioni. La sensibilità e caratteristiche del protocollo lo rendono applicabile all'identificazione e quantificazione di adenovirus direttamente in campioni clinici.
