

comunicazioni orali

SESSIONE I

Appropriatezza e nuovi standard tecnologici in Microbiologia

Mercoledì 15 ottobre 2003, 9.00-13.00 Sala Michelangelo Palazzo dei Congressi, piano-I

CO1.1

USO DI PANNELLI MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE DI AGENTI EZIOLOGICI DI GASTROENTERITI ACUTE VIRALI

Minosse C.; Zaniratti M.S.; Calcaterra S.; Carletti F.; Pisciotta M.; Narciso P.; Anzidei G.; Capobianchi M.R.

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani" Roma.

Numerosi sono i virus coinvolti nell'insorgenza di gastroenteriti acute, tuttavia un'alta percentuale di queste rimane non diagnosticata a causa della mancanza di adeguati metodi di laboratorio.

In questo lavoro è stata effettuata una valutazione retrospettiva su campioni di feci giunti nel nostro laboratorio nel periodo compreso fra il Dicembre 2000 e il Settembre 2002, conservati a -80°C .

Gli acidi nucleici sono stati estratti con il "Boom method". I primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione sono stati scelti dalla letteratura. L'identificazione del virus è stata confermata attraverso l'analisi RFLP o attraverso il sequenziamento diretto dei prodotti di PCR.

Il numero totale di campioni analizzati è stato 103.

In base alle specifiche richieste mediche relative ad ogni campione, solo 15 casi (14.6%) sono stati correttamente diagnosticati. Tuttavia, applicando l'intero pannello di PCR da noi messo a punto, sono risultati positivi ad uno o più virus 37 campioni (35.9%): 10 (9.7%) sono risultati positivi agli Enterovirus; i Rotavirus sono stati documentati in 12 casi (11.6%); Astrovirus e Norovirus sono stati trovati in 4 e 5 casi (3.9% e 4.8%) rispettivamente. Gli Adenovirus sono

stati identificati in 10 campioni (9.7%); l'HAV è stato trovato in 2 casi (1.9%); nessun caso è risultato HEV-positivo. Genomi virali multipli sono stati identificati in 5 casi (4.8%): Rotavirus+Adenovirus (1 caso), Enterovirus+Rotavirus (2 casi), Rotavirus+Astrovirus (1 caso), Rotavirus+Adenovirus+Enterovirus (1 caso). I risultati indicano un'alta prevalenza di virus in feci di pazienti con ANEG, comprendenti più frequentemente Rotaviruses, Adenoviruses ed Enteroviruses. Non è rara la coinfezione di virus. Sulla base della specifica richiesta medica, solo meno della metà dei casi sarebbe diagnosticata come associata a virus, mentre applicando l'intero pannello di PCR si amplifica la possibilità di identificare virus. I nostri dati indicano una urgente necessità di stabilire un pannello molecolare diagnostico specifico e sensibile, in grado di valutare la presenza dei più diffusi virus enterotropi.

CO1.2

BIOBANKING: L'ESPERIENZA DELLA MICROBIOLOGIA DEL CRO DI AVIANO

Tedeschi R., Bidoli E.*, Zanussi S., Bortolin M.T., Pratesi C., Pivetta E., D'Andrea M., Ros M., Averna P., Varaschin P., Crepaldi C., Costanzo C. & De Paoli P.

*Unità Complessa di Microbiologia-Immunologia e Virologia & *Epidemiologia, Centro di Riferimento Oncologico, IRCCS, Aviano.*

Introduzione e Scopo. La disponibilità di campioni biologici (siero, plasma, cellule PBMCs e biopsie) accuratamente raccolti e conservati, catalogati in un database successivamente incrociabile rapidamente ad archivi esterni è fondamentale per l'organizzazione di vari studi (coorte, caso-controllo, localizzazione di infezioni e sopravvivenza).

Proponiamo la nostra esperienza nell'intento di realiz-

zare un sistema di Biobanking con alcune sue applicazioni pratiche.

Materiali e Metodi. Un prelievo di sangue viene effettuato nei pazienti inclusi nei diversi protocolli di studio, in quelli oncologici e/o HIV+ in follow-up. Si ricavano almeno due (o più) aliquote di siero, plasma e PBMCs, immediatamente storate a -80°C . Alcuni studi prevedono inoltre una biopsia (epatica, rinofaringea). Database separati ed in formati diversi raccolgono informazioni anagrafico/cliniche incrociate mediante una chiave anagrafica tramite il SAS® e fornite anonime agli utenti. Archivi esterni al reparto (es. epidemiologici) possono essere inclusi ai fini di stratificazione, confondimento e interazione. Istruzioni, in chiaro e peer-reviewed dagli utenti stessi, gestiscono l'input, il merge, le statistiche ed i report, con possibilità per gli utenti di creare funzioni aggiuntive.

Risultati. Da Ottobre 1999 a Dicembre 2002 sono stati raccolti campioni di plasma, siero e PBMCs con diversa tempistica da 613 pazienti HIV+ e 384 pazienti HIV- afferenti al nostro Istituto. Sono stati classificati: 70 NHL HIV+ e 142 NHL HIV-; 16 HD HIV+ e 35 HD HIV-; 11 MM HIV- e 1 MM HIV+; 17 KS HIV+; 42 UCNT. Applicazioni pratiche del metodo: studio sulla correlazione dei livelli di HCV-RNA su siero e su biopsia epatica in pazienti HIV-HCV coinfecti durante il follow-up clinico-terapeutico (Tedeschi et al. J Clin Microbiol); studio sull'associazione tra reattività anticorpale verso *Borrelia* e NHL cutaneo (Dal Maso et al. submitted).

Considerazioni Conclusive. Il Biobanking consente di accumulare un largo numero di campioni per studi sierologici e molecolari di varia natura, di aumentare la potenza degli studi e rendere possibili esperienze intercollaborative e interscambi di materiale. E' inoltre di stimolo ad un controllo di qualità per lo stoccaggio dei campioni. Tale sistema, in continuo aggiornamento, richiede un notevole impegno sia nel trattare i campioni e i dati che nel raccogliarli (schede pazienti) e non meno delicati sono gli aspetti etici e legali.

CO1.3

DIAGNOSI DI LABORATORIO DI AMEBIASI MEDIANTE REAZIONE POLIMERASICA A CATENA (PCR)

Calderaro A., Bommezzadri S, Incaprera M., Piccolo G., Zuelli C., Guégan R., Villanacci V., Piralì F., Viviani G., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università di Parma, Viale Gramsci 14 43100 Parma;

¹Secondo Dipartimento di Patologia Chirurgica, Spedali Civili, Università di Brescia, via Spedali Civili 1, 25123 Brescia;

²Ospedale S. Orsola Fatebenefratelli, Brescia.

Introduzione. Al fine di superare i limiti dell'indagine microscopica e di ridurre i tempi necessari per una corretta identificazione di *E. histolytica*, agente eziologico di amebiasi intestinale ed extra-intestinale e di *E. dispar* non patogena, è stato introdotto nel nostro laboratorio un idoneo saggio basato sulla reazione polimerasica a catena (PCR).

Materiali e Metodi. Sono stati sottoposti all'esame microscopico, culturale, ricerca degli antigeni specifici di *E. histolytica* e *E. dispar* e alla PCR, campioni di feci e aspirato da ascesso epatico di un paziente con addome acuto e appendicite complicata di incerta eziologia e campioni di feci e biopsie intestinali ottenuti da un secondo paziente con sospetto morbo di Crohn. Per la PCR, il DNA è stato estratto con il sistema "HPPT" (Roche), amplificato con i "primers" EHD2/EDh26 (*E. histolytica*) e i "primers" EHD2/ED27 (*E. dispar*) e il prodotto (135 pb) rivelato mediante elettroforesi in gel di agarosio. Anticorpi specifici anti *E. histolytica* sono stati ricercati in campioni di sangue di entrambi i pazienti.

Risultati e Conclusioni. Nel primo caso (sospetta amebiasi), la PCR ha consentito di confermare la diagnosi sierologica di amebiasi extra-intestinale (titolo 1:1024) rivelando la presenza del DNA di *E. histolytica* nell'aspirato da ascesso epatico quando i metodi tradizionali (esame microscopico e culturale) hanno dato esito negativo.

Nel secondo caso (sospetto morbo di Crohn), la PCR è stata di valido supporto all'esame microscopico e culturale nell'identificazione rapida di *E. histolytica* isolata dal campione di feci. Inoltre, il ritrovamento del DNA dell'ameba nelle biopsie della mucosa colica ha consentito di porre rapidamente una corretta diagnosi di amebiasi confermando la diagnosi sierologica (titolo 1:1024). Infine, nelle biopsie coliche dello stesso paziente è stato ritrovato anche il DNA di *Brachyspira pilosicoli* e di *B. aalborgi* dimostrando, per la prima volta in assoluto, una coinfezione da ameba e spirochete intestinali.