

M071**IMPORTANZA DELLA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER ALLONTANARE SOSTANZE INIBENTI L'AMPLIFICAZIONE UTILIZZANDO IL "MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DIRECT TEST"**

Riva R., Carcheri M., Ciacci P., Graziani A., Lacitignola G., Mentasti M., Pastorino I., Ventura A., Zanin C., Capuzzo R..

Laboratorio Chimico Clinico e Microbiologico -
Az. Ospedaliera "Villa Scassi" - Genova

Obiettivi

Per evitare falsi negativi nei test di amplificazione se presenti inibitori occorrerebbe un controllo interno di amplificazione. Pensiamo che in assenza di questo un trattamento del campione accurato possa eliminare preventivamente gli inibitori.

Metodi

Nel nostro laboratorio usiamo dal 1994 il: "Mycobacterium tuberculosis Direct Test" (MTD test, Gen-Probe), riformulato nel 1997 per aumentarne la sensibilità, con volume campione passato da 100 a 450 ml., conseguentemente maggiore sensibilità ad eventuali inibitori.

Riscontrato questo fatto nei primi mesi d'uso dell'MTD test II allorché Aspirati Bronchiali e Versamenti Pleurici, abitualmente addizionati di un prodotto commerciale anticoagulante e lisante, hanno fornito amplificazione negativa contro esami microscopico e colturali positivi.

Controllata ogni fase di preparazione campione ed esecuzione test, verificata corrispondenza tra amplificazione negativa e presenza del prodotto, ne abbiamo controllato i singoli costituenti.

Abbiamo verificato che la presenza di 153 mg/ml di Sodiopolyanetosulfonato inibisce l'amplificazione. Solo ripetuti ed abbondanti lavaggi del pellet hanno permesso di superare il problema.

Sostituito il prodotto con un altro, verificato con il produttore, abbiamo utilizzato l'esperienza per migliorare il protocollo di preparazione dei campioni onde eliminare preventivamente eventuali inibitori.

Risultati

Partendo dal pretrattamento raccomandato (CDC); per campioni fluidi (urina, liquido seminale, pus, liquor, versamento pleurico e peritoneale) procediamo a 2 lavaggi supplementari con 40 ml di H₂O distillata prima della decontaminazione con N-A-L-C e NaOH 2% per 15 minuti, per materiali da fluidificare o omogeneizzare i 2 lavaggi sono effettuati sul pellet, dopo neutralizzazione con tampone fosfato, con 40 ml dello stesso.

Esaminando i risultati di nove anni di attività su oltre 2700 campioni sottoposti a MTD test si ha una elevatissima correlazione tra questo e gli esami colturali.

Conclusioni

Le precauzioni adottate nel trattamento dei campioni dei materiali da sottoporre ad amplificazione sembrerebbero garantire la possibilità di applicare tale test anche a materiali con eventuali inibitori.

M072**VALUTAZIONE DI UNA REAL-TIME PCR PER LA QUANTIZZAZIONE VIREMICA DELL'HCV RNA**

Caldarelli-Stefano R., Panzeri M.P.*, Cambiè G.*, Molina V.

Laboratorio Analisi, sez. Diagnostica Molecolare, CAM, Monza (Mi) - Laboratorio Biologia Molecolare, Centro Trasfusionale, Ospedale di Lodi.

La determinazione del livello sierico dell'RNA del virus dell'epatite C (HCV) risulta di estrema importanza nella valutazione dell'effetto della terapia nei pazienti in trattamento.

Dai dati presenti in letteratura, la real-time PCR si dimostra una tecnica sensibile e accurata per la quantizzazione degli acidi nucleici, ma è ancora poco utilizzata nei laboratori analisi per determinare l'RNA dell'HCV per diversi motivi, tra i quali la necessità di personale specializzato. Inoltre, i kit commerciali non sono ancora ampiamente diffusi ed in alternativa vengono utilizzati essenzialmente il sistema branched-DNA (Bayer) o Amplicor monitor (Roche Diagnostics).

Il nostro laboratorio ha messo a punto una metodica in real-time per determinare la carica viremica dell'HCV RNA nel plasma o nel siero, in cui viene utilizzato il colorante SYBR Green come fluoroforo. Sono stati disegnati due primers nella regione conservata 5' non codificante, in modo da poter rilevare tutti i diversi genotipi. Sono stati analizzati campioni di plasma provenienti dalla seroteca del Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Lodi, in cui era stata determinata la carica viremica utilizzando la metodica branched-DNA.

Come standard di riferimento è stato utilizzato uno standard internazionale di 10⁶ UI/ml diluito più volte per costruire una curva, con una concentrazione finale di 102 UI/ml. Le reazioni sono state verificate per mezzo delle curve di melting. Il confronto tra le due metodiche, branched-DNA e real-time PCR ha dimostrato risultati non completamente paragonabili fra loro, suggerendo che il valore di HCV RNA di un campione può differire a seconda del procedimento impiegato, indicando che il laboratorio deve sempre dare un'indicazione relativa al metodo di determinazione utilizzato, in modo che il clinico possa valutare il risultato nel corso del monitoraggio dei pazienti.

M073**CERTIFICAZIONE "EVOLUTA" DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA: UN IMPORTANTE OBIETTIVO RAGGIUNTO E DA CONSOLIDARE**

¹Venturelli C., ²Mantovani G., ³Baraghini G.F., ⁴Rumpianesi F.

¹Laboratorio di Microbiologia e Virologia,

²Ufficio Qualità, Azienda Ospedaliera Policlinico, Via del Pozzo 71, 41100 Modena

Il nostro laboratorio ha intrapreso il percorso per lo sviluppo e la realizzazione di un Sistema Qualità nel 1998. L'obiettivo era l'adeguamento ai requisiti dell'accreditamento istituzionale Regionale (D.Lgs. 229 e 517) e nel caso se ne creassero le condizioni la sua certificazione secondo la normativa UNI EN ISO 9002.

Tutto questo si è sviluppato con il supporto dell'Ufficio Qualità dell'Azienda che ci propose di partecipare ad una sperimentazione per giungere ad una Certificazione

“Evoluta”. Il Sistema qualità alla base di tale tipo di certificazione è una risposta ad un uso troppo “burocratico” delle norme ISO 9000 ed è basato essenzialmente sulla misurazione dell’efficacia del lavoro attraverso una “revisione tra pari”, sulla valorizzazione del ruolo del Laboratorio nel rapporto con i Clinici (produzione di linee guida; iniziative di audit, ecc) e sulla partecipazione a progetti per la valutazione dell’uso appropriato delle risorse. Le principali tappe del lavoro sono state: scrivere una “mission” e definire degli obiettivi coerenti con questa; coinvolgere gli operatori; acquisire una mentalità che portasse a pianificare gli obiettivi ed a verificarli periodicamente.

Il Sistema è stato sottoposto a verifiche ispettive interne ed esterne ed ha ottenuto la Certificazione nel dicembre 2002. Il sistema qualità certificato è caratterizzato da:

- Presenza nelle Visite Ispettive oltre che di un sistemista, anche di un autorevole esperto del settore per verificare l’efficacia del lavoro
- Costante lavoro di consulenza con i Clinici, con produzione di Linee Guida per la definizione di percorsi diagnostici appropriati
- Costante verifica della attività mediante Audit clinici ed azioni mirate con i reparti
- Gestione degli eventi indesiderati nella fase pre-analitica, analitica e post analitica
- Verifica della customer satisfaction dei clienti interni

La Certificazione “Evoluta” è una strategia e una esperienza che ci permette di tendere insieme al miglioramento continuo, alla soddisfazione dei clienti interni e, soprattutto, di confrontarci con autorevoli professionisti sulla correttezza del nostro approccio, con il risultato di sentirci confortati sulla validità del nostro sistema qualità ma anche delle nostre competenze professionali e questo, fa la differenza.

M074

ATTIVITA' DI CEFTAZIDIME E TOBRAMICINA IN ASSOCIAZIONE CON VANCOMICINA NEI CONFRONTI DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

Bertero F, Dho G, Marchese A., Debbia E.A.

Sez. di Microbiologia, Università di Genova.

Le infezioni sostenute da *P.aeruginosa* sono difficili da trattare a causa della sempre più frequente multi-resistenza agli antibiotici di questo patogeno. Per valutare nuove possibili opzioni terapeutiche, il ceftazidime (CAZ) e la tobramicina (TOB) sono stati saggiati in combinazione con la vancomicina (VAN).

Almeno 10⁹ CFU/ml sono state seminate su piastre contenenti una concentrazione fissa di VAN (500 mg/L) e dosi scalari (2x, 4x, 8x, e 16xMIC) di CAZ o TOB. I sopravvissuti sono stati contati dopo 48 ore a 37°C. I risultati sono stati interpretati come sinergismo (99%), additività (90%) e indifferenza (0-10%) sulla base della riduzione delle CFU/ml ritrovate con gli antibiotici in combinazione rispetto al singolo composto.

CAZ in combinazione con VAN ha reagito in modo sinergico in 5/18 casi, additività è stata trovata in 10/18 interazioni e 3 saggi su 18 hanno mostrato indifferenza. Quando TOB è stata aggiunta a VAN è stato registrato sinergismo in 2/18 casi, 7/18 interazioni sono risultate additive e le rimanenti 9 hanno mostrato una reazione indifferente. La concentrazione di VAN (500mg/L) è stata quella che ha dato i risultati riproducibili rispetto a dosi inferiori.

VAN ha dimostrato di interagire in modo favorevole con gli altri antibiotici saggiati nei confronti di *P.aeruginosa*. Questo

dato può suggerire una nuova e interessante opzione per il trattamento di questo patogeno specialmente in situazioni dove questi farmaci possono essere amministrati per via topica. La possibilità di usare VAN in condizioni meno restrittive è oggetto di studio a causa del modo d’azione di questa molecola che raramente seleziona microrganismi resistenti.

M075

IL CONTROLLO DI QUALITÀ NELL'IMPIEGO DELLA PCR APPLICATA ALLA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DELL'HCV-RNA.

Giuliani G., Drago L., Musardo P., Gismondo MR.

Laboratorio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera-Polo Uni versitario “Ospedale Luigi Sacco” Milano.

La PCR rappresenta uno strumento largamente diffuso nei laboratori di Microbiologia Clinica, specialmente quando applicato alla diagnosi ed al monitoraggio di infezioni virali come quella da HCV.

Va comunque sottolineato che la PCR e le tecniche ad essa correlate, nonostante i tentativi di automazione, sono ancora in una fase *artigianale* in cui l’esperienza ed il bagaglio tecnico dell’operatore rappresentano ancora la variabile più importante per la buona riuscita del dosaggio.

Nasce così l’esigenza di standardizzare quanto più è possibile i tests molecolari utilizzati, adottando criteri di Controllo di Qualità.

A tal fine si è voluto allestire una serie di esperimenti in grado di valutare e gestire le problematiche della PCR applicata alla determinazione qualitativa dell’HCV-RNA.

Materiali e metodi: per lo studio sono state utilizzate 2 preparazioni HCV-RNA lotto *ISS0498* (HCV-RNA genotipo 1, 1.700 UI/ml) e lotto *ISSHC* (HCV-RNA genotipo 1, 10.000-20.000 UI/ml) distribuite dal Reparto Prodotti Immunologici (Laboratorio Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma) ed allestiti i seguenti esperimenti: 1. Detection Limit (cut-off): sono state allestite 5 serie indipendenti di diluizioni alle concentrazioni finali di 150UI (30 pool), 100UI (30 pool), 50UI (30 pool), 32UI (30 pool), 10UI (30 pool). 2. Robustezza: 4 sedute analitiche di un pannello di 10 pool di plasma HCV-RNA/anti HCV negativi portati alla concentrazione finale 3xcut-off. 3. Cross-contaminazione: 5 sedute analitiche di un pannello di 20 pool di plasma (10 pool negativi e 10 pool positivi alla concentrazione di 1000-2000UI/ml). Per la determinazione dell’HCV-RNA è stato utilizzato il Kit Cobas AmpliScreen™ HCV Test, v.2.0 (Roche Diagnostics).

Risultati e Conclusioni: i risultati hanno dimostrato che l’adozione di definiti criteri di controllo di qualità permettono: a) di calcolare, all’interno del proprio laboratorio (run-control), il reale livello di sensibilità della tecnologia utilizzata, indipendentemente dal valore di cut-off indicato sul kit commerciale (nel nostro studio: detection limit 32UI/ml); b) di esprimere i concetti di affidabilità di una tecnologia e di attendibilità dei risultati valutandone la robustezza (nel nostro studio: 100%); c) quantificare la percentuale di cross-contaminazione all’interno del proprio laboratorio (nel nostro studio: 1%).