

156

QUANTIZZAZIONE DI HCMV-DNA IN RT-PCR: VALUTAZIONE DI UNA RETTA DI CALIBRAZIONE ESTERNA.

Verzaro S., Mancini C., Nazzari C., Latte M.C., Fabri G., Gaeta, A.

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università degli Studi "La Sapienza", P.le A. Moro 5, 00185 Roma

Introduzione. Nello studio delle infezioni da HCMV in pazienti trapiantati, è importante effettuare un'analisi di tipo quantitativo al fine di evidenziare la presenza di un'infezione virale attiva. L'approccio diagnostico migliore a tutt'oggi risulta essere la RT-PCR che utilizza, per la quantizzazione del DNA virale nei campioni clinici, una curva standard costruita, in ogni singola seduta, sulla base di quattro campioni con numero di copie genomiche noto.

Il presente lavoro è stato svolto allo scopo di valutare metodi alternativi per la quantizzazione del genoma virale. A tale fine gli stessi campioni clinici sono stati analizzati costruendo una retta media con i valori delle curve standard delle singole sedute; inoltre i medesimi sono stati analizzati considerando la pendenza della retta media e tenendo conto della variazione dell'intercetta in ogni singola seduta.

Metodi. Campioni clinici ottenuti da pazienti afferenti all'Unità Trapianti del Policlinico "Umberto I" di Roma, sono stati analizzati mediante HCMV RT-PCR in 96 sedute analitiche tra Gennaio e Dicembre 2006. I dati relativi agli standard (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5) di tutte le sedute sono stati utilizzati per costruire una retta media impiegata per la quantizzazione in doppio delle copie genomiche relative a 200 campioni positivi.

Inoltre è stato considerato elemento indicatore della variazione dell'intercetta lo standard con copie genomiche pari a 10^3 .

I risultati ottenuti con le varie metodiche sono stati analizzati statisticamente mediante test di correlazione, test di regressione e test t di Student.

Risultati. I dati quantitativi ottenuti con i metodi alternativi sono comparabili con quelli osservati mediante la curva standard giornaliera, risultando perfettamente sovrapponibili i valori entro le 10000 copie/ml. Si sono notate differenze, seppur in un range di accettabilità, per le quantità superiori.

Conclusioni. I metodi considerati in tale studio sono risultati essere affidabili al pari della curva standard giornaliera. Pertanto, a nostro parere, possono costituire una valida alternativa nella valutazione quantitativa del DNA virale, garantendo pari sensibilità e accuratezza con minori costi di lavorazione.

157

UTILIZZO DELLA REAL TIME PCR PER LA DIAGNOSI DI ASPERGILLOSI IN PAZIENTI IMMUNOCOMPROMESSI

Zappia E.¹, Musso M.², Orsini S.¹, Ribero S.¹, Ungari S.¹, Bertone F.³, Davit A.³, Gallamini A.³, Mattei D.³, Bracco G.¹

¹S.C. Lab. Analisi - Biologia Molecolare,

²S.C. Lab. Analisi - Proteine ed Allergologia,

³S.C. Ematologia, A.S.O. Santa Croce e Carle - Cuneo

Introduzione. Nei pazienti immunocompromessi l'Aspergilloso Invasivo (AI) è la più comune infezione fungina. La frequenza di mortalità raggiunge il 90% nell'ambito dei trapianti di midollo osseo. La metodologia diagnostica utilizzata fin'ora si basa su tecniche culturali che forniscono una risposta tardiva, e/o sull'antigenemia, tramite dosaggio del galattomannano in ELISA che ha limiti di specificità e sensibilità. Il nostro obiettivo è stato testare l'utilizzo della Real Time PCR.

Metodi. Sono stati raccolti 26 campioni di sangue da 10 pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo. I pazienti sono stati selezionati sulla base dei sintomi clinici per AI, secondo i criteri EORTC.

Il DNA è stato estratto utilizzando il MagNApure LC DNA isolation kit III (Roche), e l'estrattore automatico MagNApure LC Instrument (Roche). Il DNA dell'Aspergillus è stato amplificato ed analizzato utilizzando il kit Affigene Aspergillus Tracer (Cepheid AB) su amplificatore MX3000P (Stratagene) secondo le istruzioni fornite dal produttore. La Real Time PCR è stata standardizzata secondo le direttive EC IVD.

Risultati. 15 campioni su 26 provenivano da 6 pazienti con diagnosi di AI Probabile, mentre i restanti 11 erano di 4 pazienti negativi per diagnosi di AI, presi come controllo. Il valore medio dell'antigenemia nei pazienti controllo era 0.06 ± 0.04 , ed in nessun caso l'analisi in Real Time ha dato esito positivo. Il valore medio dell'antigenemia con AI probabile era 1.7 ± 1 . L'analisi in Real Time PCR con Affigene Aspergillus Tracer ha rilevato positività per il DNA dell'Aspergillo in 4 dei 6 pazienti AI Probabili.

Conclusioni. La Real Time PCR Affigene Aspergillus Tracer sembra essere applicabile alla diagnosi precoce di AI in pazienti immunocompromessi, in combinazione con la valutazione dei sintomi clinici secondo i criteri EORTC.