

P191

RICERCA DI HPV SU SISTEMA THINPREP E TIPIZZAZIONE MEDIANTE IL TEST INNO-LIPA HPV GENOTYPING

Marcante R.; Panozzo P.; Pinalto N.; Cavedon G.

Unità Semplice di Virologia-Laboratorio Analisi O.C. SCHIO

La ricerca di HPV è stata eseguita su 307 campioni prelevati da donne con anomalie citologiche al pap-test (Ascus, LSIL, HSIL). L'estrazione del DNA (CLEAN DNA, A.B. ANALITICA, PD.) è stata eseguita partendo dallo stesso materiale prelevato per l'esecuzione del pap test con il sistema per la citologia in fase liquida (ThinPrep). La amplificazione è stata effettuata mediante un sistema di PCR che utilizza i primers degenerati MY09/11, in grado di amplificare una sequenza di 450 b.p appartenente alla regione L1 di HPV (Ampliquality HPV, A.B. ANALITICA, PD.) Su tutti i campioni è stata inoltre amplificata la b-globina per verificare la adeguatezza del materiale estratto. Solo 5 campioni sono risultati non idonei all'amplificazione di HPV. I campioni evidenziati come positivi sono stati pertanto 59 su 302 (19.5%). La percentuale di positività è stata rispettivamente del 13.9% nei campioni con ASCUS e del 58.38% nei campioni con lesioni di basso e alto grado. La tipizzazione degli isolati di HPV è stata eseguita mediante analisi di restrizione del frammento amplificato utilizzando 3 enzimi (RsaI, HaeIII e PstI). Le corse elettroforetiche su Metaphor agar sono state analizzate mediante analisi di immagine su sistema Gel Doc 2000. Quaranta campioni positivi per HPV sono stati inoltre tipizzati con il sistema commerciale INNO-LiPA HPV Genotyping (INNOGENETICS) che prevede la amplificazione di un frammento di 65 b.p. nella regione L1. Gli ampliconi biotinilati e denaturati, sono stati ibridati con probes immobilizzati su strisce di nitrocellulosa specifici per 22 differenti genotipi di HPV. Il confronto tra i due sistemi di identificazione di HPV ha permesso di trarre alcune considerazioni: 1) I due sistemi concordano nei campioni in cui è presente un solo genotipo. 2) Il sistema INNO-LiPA sembra evidenziare un maggior numero di infezioni miste alcune delle quali non riscontrate con l'analisi di restrizione. 3) L'analisi di restrizione è difficilmente interpretabile nel caso di infezioni miste. 4) L'analisi di restrizione non permette di identificare il genotipo nei campioni con debole banda di positività allo screening mentre il test INNO-LiPA è in grado di fornire il genotipo anche su questi campioni. 5) Alcuni campioni positivi al test di screening sono risultati non tipizzabili con il sistema INNO-LiPA.

P192

CYTOMEGALOVIRUS IGG AVIDITY: VALIDITÀ DEL TEST PER LA DETERMINAZIONE DELLO STATO CLINICO DEL PAZIENTE.

Mazzarelli G.*, Parri F.*, Dal Maso G.***, Paoli C.**

*Laboratorio di Sieroimmunologia A.O.U.C. Careggi
viale Pieraccini 17 Firenze

** Dienes S.p.A. via delle Rose 10 53035 Monteriggioni Siena

Il significato diagnostico e l'importanza della determinazione dell'avidity degli anticorpi IgG verso un determinato antigene sono oramai noti da tempo. Con il presente studio si intende valutare le prestazioni del Kit Enzywell

Cytomegalovirus IgG Avidity (Dienes) con su campioni di siero pervenuti presso il Laboratorio di Sieroimmunologia con richiesta di ricerca di anticorpi anti Cytomegalovirus. 207 sieri sono stati testati, di questi si conosceva la storia clinica del paziente, il reparto di provenienza e i risultati ottenuti con i kit Vidas IgG e IgM (Biomerieux); i campioni risultati IgM positivi venivano ulteriormente testati con il kit Enzygnost Anti CMV /IgM (DADE Behring).

In base alle suddette informazioni i 207 sieri sono stati suddivisi in 4 distinti gruppi di appartenenza:

Pazienti con infezione pregressa. (n=166)

Pazienti trapiantati renali (n= 19)

Pazienti con infezioni primarie (n= 17)

CMV IgM Falsi Positivi (n=5)

I gruppi 1 e 4 mostravano valori di Avidity compresi tra 50 e 99%. Nel gruppo 3 l'avidity rilevata variava da un minimo di 6 ad un massimo di 35%; nel gruppo dei pazienti trapiantati i valori di avidity erano maggiori del 50% in tutti i soggetti.

I dati ottenuti confermano le buone prestazioni del kit discriminando correttamente i pazienti con infezione acuta in atto da quelli con infezione pregressa, con valori di avidity che aumentano con il passare del tempo dalla fase acuta dell'infezione.

Il test si conferma nella sua utilità nel caso di reazioni aspecifiche in IgM.

La determinazione dell'avidity degli anticorpi IgG anti Cytomegalovirus nei pazienti trapiantati, è risultata di relativo significato diagnostico.

P193

DIAGNOSI RAPIDA DI INFEZIONE DA ADENOVIRUS UMANI MEDIANTE REAZIONE POLIMERASICA A CATENA DI TIPO NESTED.

M.C., Aloisi A., Martinelli M., Abelli L.A., Arcangeletti M.C., Pinardi F., De Conto F., Valcavi P., Casula F., Calderaro A., Chezzi C. e Dettori G.

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi,
Viale Antonio Gramsci 14, 43100 Parma

Gli adenovirus umani causano una grande varietà di sindromi cliniche che comprendono, tra le più frequenti, enterite e malattia respiratoria acuta come pure congiuntivite. I metodi avanzati di amplificazione genica offrono una vantaggiosa alternativa ai metodi considerati ormai tradizionali (coltura cellulare, microscopia elettronica-ME, immunofluorescenza-IF, agglutinazione al lattice e saggio immunoenzimatico) per la rivelazione di adenovirus nei campioni clinici.

In questa nota vengono riferiti gli esiti delle prime prove per la valutazione di un saggio diagnostico commerciale ("Adenovirus-oligomix", Amplimedical, Italia) per l'amplificazione mediante nPCR di un frammento genomico codificante per l'esone capsidico di adenovirus.

La specificità dei "primers" è stata dimostrata dall'esito negativo ottenuto dal saggio di 14 campioni clinici contenenti virus diversi da adenovirus che possono infettare gli apparati respiratorio e intestinale e l'occhio.

L'nPCR ha rivelato DNA di adenovirus in 5 di 39 (12,8%) secrezioni respiratorie, 6 di 22 (27,3%) feci e nessuno di 2 (0%) tamponi congiuntivali appartenenti a pazienti pediatrici ricoverati in gennaio 2004 con sindrome respiratoria, gastroenterica o congiuntivite, rispettivamente, risultati negativi per altri virus mediante metodo colturale e/o IF sulle secrezioni respiratorie e/o ME sulle feci.

Dal confronto degli esiti ottenuti mediante questi ultimi metodi per la rivelazione di adenovirus, l'nPCR ha dimostrato maggior sensibilità sia del metodo colturale (5 vs 2 secrezioni respiratorie positive e 6 vs 4 feci positive) sia dell'IF (5 vs 0 secrezioni respiratorie positive) e della ME (6 vs 2 feci positive). Complessivamente l'nPCR ha consentito di porre diagnosi di infezione nel 7,7% e nel 9,1% in più rispetto all'impiego in diversa combinazione dei metodi tradizionali sulle secrezioni respiratorie e sulle feci, rispettivamente. In conclusione, dalle prime prove condotte l'nPCR sembra essere utile per una diagnosi rapida di infezione da adenovirus con una sensibilità maggiore dei metodi correntemente in uso, almeno nelle infezioni respiratorie ed enteriche in età pediatrica. I risultati verranno discussi anche in relazione agli esiti della determinazione del limite di rivelabilità del saggio.

P194

EPISODIO EPIDEMICO NOSOCOMIALE DI ENTERITE SOSTENUTO DA NOROVIRUS IN PAZIENTI PEDIATRICI RICOVERATI.

M.C., Martinelli M., Abelli L.A., Aloisi A., Arcangeletti M.C., De Conto F., Pinardi F., Valcavi P., Casula F., Calderaro A., Chezzi C. e Dettori G.

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Parma, Viale Antonio Gramsci 14, 43100 Parma.

All'inizio di febbraio 2004 presso l'U.O. di Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma sono state osservate nello stesso giorno alla microscopia elettronica particelle calicivirus-simili in 2 campioni di feci (in un caso associate a particelle reovirus-simili) appartenenti ad altrettanti piccoli pazienti colpiti da enterite alcuni giorni dopo il ricovero per patologie a carico di apparati diversi dall'intestino.

Per verificare la presenza nei reparti pediatrici di un possibile focolaio epidemico di enterite da norovirus, è stata condotta la ricerca dell'RNA virale mediante RT-PCR sia sui campioni di feci appartenenti a pazienti pediatrici ricoverati con sindrome gastroenterica acuta e pervenuti presso l'U.O. di Virologia per indagini virologiche nel corso del mese di gennaio e conservati congelati, sia prospetticamente su quei campioni che hanno presentato le stesse caratteristiche nella settimana successiva al ritrovamento iniziale.

Di 53 bambini esaminati, 14 (26,4%) hanno rivelato la presenza dell'RNA virale nelle feci. Di questi ultimi è stato riscontrato che in 6 casi, inclusi i due primi sospetti di infezione nosocomiale, l'enterite è comparsa almeno 24 ore dopo il ricovero per altre patologie e in tutti i casi tranne uno (5 casi su 6) nell'arco di quattro giorni. L'analisi delle sequenze dei ceppi virali rivelati ha dimostrato che 13 appartenevano allo stesso genotipo.

Sulla base dei dati anamnestici e clinici e in relazione alla caratterizzazione molecolare dei ceppi è molto probabile che alcuni pazienti ricoverati per sindrome gastroenterica siano stati la sorgente del focolaio epidemico da norovirus.

Gli autori concludono evidenziando l'importanza epidemiologica dell'infezione nosocomiale sostenuta da norovirus e suggeriscono che una diagnosi rapida e precoce di infezione è indispensabile per ridurre la diffusione dell'enterite nei reparti pediatrici attraverso il tempestivo rafforzamento delle misure di controllo. I risultati verranno discussi anche in relazione agli esiti delle indagini per il completamento della sorveglianza al fine di definire l'estensione dell'episodio epidemico nosocomiale.

P195

PREVALENZA DI INFEZIONE DA ROTAVIRUS, ADENOVIRUS ED ASTROVIRUS IN PAZIENTI CON GASTROENTERITE ACUTA

Minchella P., Leone R.A., Nisticò S., Potente G.I., Caruso D., Camerino M., Nicolazzo A., Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, Azienda Sanitaria N. 6, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Scopo del lavoro.

Valutare la prevalenza di infezione da Rotavirus, Adenovirus ed Astrovirus nei pazienti sintomatici per gastroenterite, afferenti alla nostra U.O. per indagini virologiche su campioni fecali.

La gastroenterite virale acuta rappresenta nei paesi industrializzati una delle più frequenti cause di morbilità nell'età pediatrica, con elevato costo sociale per cure mediche ed eventuali ricoveri ospedalieri.

I virus riconosciuti come più importanti agenti eziologici sono Rotavirus di gruppo A, Adenovirus tipo 40 e 41, Astrovirus e Calicivirus.

Sono soprattutto i Rotavirus responsabili delle forme più gravi e disidratanti, coinvolti nel 30-35% delle ospedalizzazioni per diarrea nell'infanzia.

Negli adulti la sintomatologia è generalmente modesta, ma infezioni più serie sono descritte in anziani ed immunodepressi.

Materiali e metodi.

Sono stati esaminati negli anni 2000-2003 campioni di feci pervenuti da 530 pazienti sintomatici, 287 maschi e 243 femmine, per la ricerca diretta di Rotavirus, Adenovirus ed Astrovirus.

Sono stati utilizzati i seguenti tests basati su tecnica immunoenzimatica (EIA), tutti della Ditta DakoCytomation: IDEIA Rotavirus che utilizza anticorpi policlonali, IDEIA Adenovirus con anticorpi monoclonali ed Amplified IDEIA Astrovirus, test di nuova generazione con tecnologia di amplificazione del segnale.

I campioni sono stati suddivisi in due gruppi in base all'età dei pazienti: 480 campioni di adulti e 50 di soggetti in età pediatrica.

Risultati.

Tra i 480 campioni di pazienti adulti è stata riscontrata positività ad almeno un test nel 4,79% dei casi (n. 23); in particolare nel 3,54% positività per Rotavirus (n. 17), 0,63% per Adenovirus (n. 3) ed anche 0,63% per Astrovirus (n. 3). Invece tra i 50 campioni di pazienti pediatrici è stata riscontrata positività nel 28% dei casi (n. 14); in particolare nel 20% positività per Rotavirus (n. 10), 4,0% per Adenovirus (n. 2) ed anche 4,0% per Astrovirus (n. 2). Soltanto in un paziente adulto è stata trovata positività contemporanea per Rotavirus ed Adenovirus.

Discussione e Conclusioni.

Dai dati ottenuti nel nostro studio si può concludere che la più importante causa di gastroenterite di origine virale è rappresentata dai Rotavirus di gruppo A, soprattutto nella popolazione pediatrica, essendo stato confermato il sospetto diagnostico con la positività della ricerca diretta nel 20% dei campioni.

Nonostante la manifestazione clinica e la fascia d'età interessata spesso già indirizzino la diagnosi, è comunque utile e vantaggiosa, anche ai fini epidemiologici, una diagnosi eziologica con la rilevazione diretta degli antigeni virali mediante un test EIA di semplice utilizzo.