

130

### NUOVA REAL TIME RT-PCR PER L'IDENTIFICAZIONE E LA RILEVAZIONE QUANTITATIVA DEL VIRUS CHIKUNGUNYA IN CAMPIONI BIOLOGICI ED IN COLTURE CELLULARI

Carletti F., Bordi L., Chiappini R., Ippolito G., Sciarone M.R., Capobianchi M.R., Di Caro A., Castilletti C.

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

**Introduzione.** Il virus Chikungunya (CHIKV) è un *alphavirus*, trasmesso all'uomo attraverso il morso di un insetto vettore, principalmente zanzare del genere *Aedes*. Una estesa epidemia è iniziata nel 2005 in un'isola dell'Oceano Indiano, possedimento territoriale della Francia, La Reunion. Dai primi mesi del 2006 l'epidemia si è estesa anche ad altre isole ed arcipelaghi dell'Oceano Indiano, oltre che ai paesi che si affacciano sulla parte orientale come Malesia, Indonesia e soprattutto India. Molti casi sono stati importati in Europa ed anche in Italia. La diagnosi d'infezione da CHIKV è fondamentale per il controllo dell'epidemia.

**Metodi.** Nei laboratori di Virologia dell'INMI è stata messa a punto una nuova Real Time RT-PCR basata su sonde FRET, che ha come gene *target* il gene nsP1. *Primers* e sonde sono stati disegnati utilizzando il LightCycler probe designer V. 2.0 software.

**Risultati.** Questo test ha una sensibilità di 20 copie/reazione ed un *range* di linearità compreso tra  $3 \times 10^1$  e  $6 \times 10^8$  copie/reazione. Il dosaggio della viremia da CHIKV su sieri di pazienti con infezione acuta va da  $1,3 \times 10^5$  a  $6 \times 10^8$  copie/reazione. Per validare il test quantitativo, sono stati realizzati esperimenti *in vitro* di inibizione della replicazione virale, mediante l'utilizzo di IFN *alpha*. La replicazione del virus è stata valutata sia titolando la capacità infettante sia dosando la quantità di RNA del virus neo-prodotto. Come atteso, abbiamo osservato un'inibizione della produzione di particelle virali sia in termini di infettività che di produzione di RNA.

**Conclusioni.** Il metodo descritto è un valido strumento per la rapida rilevazione del Virus Chikungunya così come per la determinazione della carica virale nei pazienti con infezione acuta. Inoltre, l'ampio *range* di linearità ne fa un ottimo strumento per gli studi *in vitro* ogniqualvolta si presenti la necessità di quantificare la replicazione virale, come accade negli studi di efficacia dei farmaci antivirali.

131

### AUMENTO DI INCIDENZA DI S. GIVE IN PIEMONTE. ANALISI MOLECOLARI E VALUTAZIONI EPIDEMIOLOGICHE

Kroumova V., Grasso S., Caroppo S., Camaggi A., Grossini E., Macaluso P., Brunelli G., Fortina G.

Azienda "Ospedale Maggiore della Carità" - Novara - Laboratorio Microbiologia e Virologia

La sorveglianza delle infezioni alimentari da Salmonella rappresenta ancora oggi un momento importante nel controllo di queste patologie. Nell'ambito della attività di prevenzione, in Piemonte, si è realizzato a partire dall'anno 2001 un pro-

gramma di sorveglianza epidemiologica.

Durante l'anno 2005 tale attività è proseguita ed ha portato alla tipizzazione sierologica di 730 ceppi di Salmonella. All'interno dei vari sierotipi identificati si è evidenziata una frequenza anomala di Salmonella enterica subsp. enterica serovar Give che, dai normali 1-2 ceppi anno, improvvisamente ha visto aumentare la sua prevalenza a 21 ceppi anno. L'analisi molecolare di questi è stata eseguita mediante PFGE utilizzando l'enzima di restrizione XbaI e mediante la metodica rep-PCR (Diversilab).

I risultati ottenuti con le due tecniche hanno evidenziato la presenza di due cluster con percentuali di similarità molto elevate al loro interno e una notevole corrispondenza tra le due metodiche. Purtroppo l'impossibilità di disporre di dati epidemiologici non consente di trarre conclusioni definitive, anche se l'ipotesi di una piccola epidemia alimentare veicolata dai canali della grande distribuzione può risultare suggestiva.

132

### VEQ IN BIOLOGIA MOLECOLARE (HCV, HIV, HBV): PRIME ESPERIENZE

Colao M.G.<sup>1</sup>, Parri F.<sup>1</sup>, Borsotti M.<sup>2</sup>, Quercioli M.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratorio di Sieroimmunologia, AOU-Careggi, (FI)

<sup>2</sup> Centro Regionale per il C.Q. AOU-Careggi (FI)

**Introduzione.** In questo lavoro vengono presentati i risultati del Programma di Verifica Esterna di Qualità per il dosaggio di HCV, HBV e HIV con tecniche di Biologia Molecolare realizzato nel 2006. Queste tecniche hanno raggiunto un ruolo consolidato nella ricerca e nella quantificazione dei genomi virali e sono utilizzate sia per la diagnosi che per la valutazione del decorso della malattia. Diventa pertanto indispensabile verificare costantemente la comparabilità dei risultati tramite una valutazione esterna della qualità.

**Materiali e Metodi.** Hanno partecipato 38 laboratori ai quali è stato inviato un campione positivo per ciascuno dei virus analizzati. Le risposte ricevute sono state 86 e sono state ottenute con metodiche sia qualitative (TMA, PCR) che quantitative (bdNA, PCR end-point, PCR real time) utilizzando come unità di misura il numero di copie/ml o unità internazionali (UI/ml).

#### Risultati. 1° Campione HCV RNA

Risposte: 32      Positivi: 30      Negativi: 2

Dei 30 positivi, 4 risposte erano qualitative e 26 quantitative, di cui 25 espresse in UI/ml e 1 in copie/ml.

I 25 valori espressi in UI/ml hanno dato media 18.465.

Esprimendo il valore in  $\log_{10}$  abbiamo ottenuto una media di 4.27 con sd 0.51 e cv pari a 11.9.

#### 2° Campione HIV RNA

Risposte: 28      Positivi: 28      Negativi: 0

Dei 28 positivi, 4 risposte erano qualitative e 24 quantitative, di cui 3 espresse in UI/ml e 21 in copie/ml.

I 24 valori espressi o trasformati in copie/ml hanno dato media 49.450.

Esprimendo il valore in  $\log_{10}$  abbiamo ottenuto una media di 4.69 con sd 0.37 e cv pari a 7.9.

#### 3° Campione HBV DNA

Risposte: 26      Positivi: 26      Negativi: 0

Dei 26 positivi, 7 risposte erano qualitative e 19 quantitative, di cui 18 espresse in UI/ml e 1 in copie/ml.

I 18 valori espressi in UI/ml hanno dato media 145.188.