

170

NEUROBORRELIOSI DI LYME E MALATTIA DI PARKINSON: STUDIO DI UN CASO POST-MORTEM

Cazzavillan S.¹, Segala C.¹, D'Amore EGS.¹, Bonoldi E.¹, Rasso M.²

¹U.O. Anatomia Patologica,

²U.O. Microbiologia e Virologia, Ospedale San Bortolo, Via Rodolfi, 36100 Vicenza, Italia.

Introduzione. La borreliosi di Lyme è un'infezione multisistemica trasmessa dalla zecca (*Ixodes*) e causata dalla spirocheta *Borrelia burgdorferi sensu lato* (BB) che provoca patologie cutanee, e, se non trattata, cardiache, reumatologiche e neurologiche. Questa infezione è endemica nell'area del triveneto. La neuroborreliosi di Lyme (LN) è molto rara e la sintomatologia può a volte essere confusa con la malattia di Parkinson (PD) o altre patologie neurodegenerative.

Metodi. Da un paziente (anni 57 M) con diagnosi clinica di PD deceduto per polmonite sono stati effettuati prelievi autoptici da corteccia cerebrale, cervelletto, ponte, nervo ottico, poligono di Willis, arteria coronaria, aorta toracica e addominale e arteria renale. I prelievi sono stati divisi in 2 parti, per l'estrazione e amplificazione del DNA (nested-PCR) e per PCR in situ. È stata ricercata una sequenza conservata del gene codificante per la flagellina di BB. Come controllo è stato utilizzato un ceppo di BB ATCC. Gli amplificati sono stati sequenziati per conferma.

Risultati. Tutti i campioni, ad esclusione del poligono di Willis, sono risultati positivi all'amplificazione sia in provetta che in situ. La sequenza ha confermato la provenienza del DNA da BB.

Conclusioni. Il paziente ha evidenziato la presenza di una infezione sistemica da BB e quindi potrebbe presumibilmente avere sviluppato una LN con sintomatologia analoga a quella associata al PD. Da questo studio emerge l'utilità di una valutazione sierologica e molecolare per la determinazione della presenza di BB in caso di sospetto di patologia neurodegenerativa non altrimenti spiegabile.

171

REAL-TIME PCR PER LA RICERCA DI HCV RNA NEL PLASMA.

Cerutti F.³, Allice T.¹, Gabella S.¹, Pittaluga F.¹, Varetto S.¹; Giliberto G.¹, Martelli S.¹, Smedile A.², Ghisetti V.¹; Marchiaro G.¹.

¹S.C. Microbiologia, Ospedale Molinette, C.so Bramante 88/90, 10126 Torino.

²Dip. Gastroenterologia, Ospedale Molinette, C.so Bramante 88/90, 10126 Torino.

³Università di Torino.

Introduzione. La strategia terapeutica per i pazienti con epatite cronica HCV-correlata è basata sulla quantizzazione di HCV-RNA prima, durante e dopo la terapia. Sono disponibili in commercio diversi test qualitativi e quantitativi basati sulla reazione di RT-PCR end-point e sulla tecnologia del DNA

ramificato (bDNA), differenti per sensibilità e range dinamico. Inoltre, in tutti questi test la fase di estrazione dell'RNA virale manca di sufficiente standardizzazione. Scopo di questo lavoro è confrontare la quantizzazione di HCV-RNA mediante bDNA (VERSANT 3.0, Bayer) con il sistema completamente automatizzato COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM, Roche) che consiste di due moduli: l'estrazione automatizzata dell'RNA da plasma/siero e la Real-Time-PCR.

Metodi. Validazione analitica su un pannello di performance a concentrazione nota; validazione clinica su 151 plasmidi di pazienti anti-HCV positivi e testati per HCV-RNA con bDNA.

Risultati. La validazione analitica ha dimostrato una buona correlazione tra valori attesi e valori osservati con CAP/CTM, su un range dinamico di 7 Logs. La validazione clinica ha evidenziato una buona correlazione tra i due metodi ($r=0,919$, $95\%CI=0,89\div0,94$) e una differenza media di quantizzazione con una leggera sottostima da parte di CAP/CTM (Differenza media \pm SD= $-0,31\pm0,43$ LogIU/ml). La valutazione in rapporto al genotipo (1 \div 4) conferma una buona correlazione tra bDNA e CAP/CTM ($0,87<r<0,96$); nei genotipi 1 \div 3 la differenza media dei valori ottenuti tra i due sistemi era di circa 0.3 log, mentre per il genotipo 4 è risultata minima ($0,014\pm0,24$). Per via della diversa sensibilità dei due sistemi (bDNA 615 UI/ml e CAP/CTM 15 UI/ml), il 71% dei campioni negativi con bDNA erano positivi con CAP/CTM, con valori compresi tra 1,6 \div 3,7 Log IU/ml.

Conclusioni. Il sistema CAP/CTM consente di quantizzare HCV-RNA su un ampio range dinamico, in modo rapido, accurato e con una eccellente sensibilità, con efficienza simile per i vari genotipi virali. Permangono differenze nella quantizzazione rispetto al metodo del bDNA che necessitano di ulteriori analisi.

172

INFEZIONE DA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN ABKAZIA: STUDIO SULL'INSORGENZA DELLE FARMACO RESISTENZE

D'Amato V.¹, Meacci F.¹, Costa C.¹, Pardini M.², Fattorini L.², Orefici G.², Varaine F.³, Bonnet M.⁴, Jarosz T.⁵, Orrù G.⁶, Isola D.⁶, Niemann S.⁷, Rüschi-Gerdes S.⁷, Rinder H.⁸, Yesilkaya H.⁹, Barer M.⁹, Andrew P.W.⁹, Oggioni M.R.¹

¹LAMMB, Dip. Biologia Molecolare, Policlinico Le Scotte Università di Siena, Italia;

²Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia;

³Médecins Sans Frontières, Parigi, Francia;

⁴Epicentre, Parigi, Francia;

⁵3Es, Parigi, Francia;

⁶Università di Cagliari, Italia;

⁷FZ Borstel, Germania;

⁸LGL Oberschleißheim Germania;

⁹University of Leicester, UK.

Introduzione. Il progetto LONG-DRUG è uno studio longitudinale, supportato dalla Comunità Europea e realizzato in Abkazia, un'area di alta prevalenza di tubercolosi multi-resistente (MDR-TB). L'obiettivo principale è la caratterizzazione molecolare delle farmaco-resistenze in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), il chiarimento della relazione epidemiologica dei cloni identificati, e la delucidazione della rilevanza clinica delle sotto-popolazioni resistenti di MTB.

Metodi. La caratterizzazione di campioni e isolati è effettua-

ta determinando la suscettibilità verso i farmaci di prima e di seconda scelta, il genotipo di resistenza tramite real time PCR, RFLP-PCR e sequenziamento e tipizzando i ceppi mediante IS-RFLP e spoligotyping. I dati sono raccolti in un database accessibile a tutti i partecipanti al progetto.

Risultati. In tre anni di studio sono stati raccolti circa 700 campioni di escreato e isolati quasi 600 ceppi di MTB, di cui 307 sono isolati seriali da 89 pazienti. Ceppi MDR sono stati rilevati in più del 20% dei pazienti. Circa la metà dei ceppi è raggruppata in cluster con identico fingerprint e spoligotype. L'analisi dei polimorfismi nucleotidici mediante real time PCR ha evidenziato la presenza di una batterica popolazione mista, wild type e mutata per alcuni marker di resistenza, nel 51% dei pazienti (34/66). La presenza di popolazioni batteriche eteroresistenti è stata confermata con tre tecniche molecolari indipendenti su campioni prelevati in duplicato e analizzati in sedi diverse.

Conclusioni. L'analisi statistica e la valutazione del significato clinico dei dati ottenuti sono attualmente in corso.

173

QUANTIZZAZIONE DI HBV-DNA IN REAL-TIME PCR: COBAS AMPLIPREP™/COBAS TAQMAN™ HBV TEST.

De Masi A.¹; Cerutti F.¹; Alice T.²; Pittaluga F.²; Varetto S.²; Martelli S.²; Gilberto G.²; Gabella S.²; Marzano A.³; Colucci G.⁴; Ghisetti V.²; Marchiaro G.².

¹Università degli studi di Torino.

²S.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino, c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

³Dipartimento di Gastroenterologia, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino, c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

⁴Roche Molecular Systems, Rotkreuz, Switzerland.

Introduzione. Il successo della terapia antivirale per l'epatite cronica HBV-correlata richiede l'utilizzo di test altamente sensibili basati sulla Polymerase-Chain-Reaction (PCR) per l'identificazione di HBV-DNA. Nel presente lavoro si è valutata la performance del sistema Real-Time-PCR COBAS AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ 48 (CAP/CTM, Roche) confrontato con il sistema semi-automatico in PCR end-point COBAS AMPLICOR HBV Monitor (CAHBM, Roche).

Materiali. Validazione analitica di CAP/CTM su un pannello di 12 standards di HBV-DNA con un titolo compreso tra 2 e 10⁹ IU/ml (AcroMetrix). Validazione clinica su 92 campioni di plasma da pazienti HbsAg-positivi, 11 dei quali in trattamento combinato Lamivudina(LAM) e Adefovir(ADF) (5 pazienti) e in monoterapia con ADF (6 pazienti).

Risultati. La validazione analitica di CAP/CTM ha mostrato una stretta correlazione tra valori attesi e valori osservati ($r=0.976$), una sensibilità del 100% a 54 IU/ml e range dinamico di 8 logaritmi. La validazione clinica ha evidenziato un'ottima correlazione con CAHBM ($r=0.966$, differenza media di 0.36 log₁₀ IU/ml tra i due metodi); il 10% di pazienti HBV-DNA CAHBM-negativi sono risultati CAP/CTM-positivi e, nei pazienti in terapia, il metodo in Real-Time ha evidenziato le viremie residue per un tempo maggiore. La terapia di combinazione LAM con ADF si è associata ad una maggiore caduta della viremia dopo 12 mesi

di trattamento rispetto alla monoterapia con ADF (5.1 vs 3.5 logaritmi).

Conclusioni. Il nuovo sistema completamente automatizzato CAP/CTM per HBV-DNA ha mostrato performance molto buone, con eccellente sensibilità e ampio range dinamico e può pertanto contribuire al monitoraggio e alla gestione clinica dell'epatite cronica da HBV.

174

MESSA A PUNTO DI UNA NESTED-PCR PER IDENTIFICARE CEPPI DI P. OVALE CON POLIMORFISMO GENETICO NEL 18S-rDNA.

Calderaro A., Piccolo G., Perandin F.¹, Gorrini C., Peruzzi S., Ricci L.², Manca N.¹, Snounou G.³, Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma;

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia;

²Arcispedale di Reggio Emilia;

³Muséum National d'Histoire Naturelle Parasitologie Comparée et Modèles Expérimentaux (USM 0307) Parigi (Francia).

Introduzione. L'utilizzo di saggi di PCR per la diagnosi di malaria ha evidenziato un aumento della prevalenza in Italia dei casi d'infezione da *P. ovale* (*Po*) sottostimata nel passato mediante microscopia. In precedenza abbiamo descritto la presenza di ceppi di *Po* probabilmente mutati nel 18S-rDNA che possono non essere rivelati dai saggi di PCR basati su questo bersaglio. Qui riportiamo la descrizione di una nuova coppia di primers per l'identificazione di questi ceppi di *Po*. **Metodi.** Centosette campioni di sangue di pazienti con sospetta malaria (microscopia: 9 *P. falciparum* (*Pf*), 12 *P. vivax* (*Pv*), 7 *Po*, 3 *P. malariae* (*Pm*), 1 *Pv/Po*, 2 *P. spp.*, 73 negativi) sono stati sottoposti a 18S-rDNA-PCRs (nested-PCR genere-specifica, nested-PCR-1993, -2002) per *Pf*, *Pv*, *Po* e *Pm*. In questo studio è stata disegnata una nuova coppia di primers (rOVA1B, rOVA2B) (nested-PCR-2005) tenendo conto delle mutazioni osservate in alcuni ceppi di *Po* nella sequenza bersaglio dei primers usati nella nested-PCR-1993. I nuovi primers sono stati valutati su 1 campione positivo per *Pf*, *Pv*, *Pm* rispettivamente e 1 negativo per plasmodi, e utilizzati per verificare la presenza di ceppi di *Po* mutati nei campioni biologici.

Risultati. La nested-PCR-2005 è stata la sola in grado di identificare correttamente *Po* nei 23 campioni di sangue in cui era presente: 20 ottenuti da casi con infezione singola e 3 da casi con infezione mista (2 *Pf+Pm+Po* e 1 *Pf+Po*). La nested-PCR-1993 e la nested-PCR-2002 hanno identificato 14 e 17 ceppi di *Po*, rispettivamente.

Conclusioni. Una corretta diagnosi di laboratorio di malaria non può prescindere dall'impiego combinato dell'esame microscopico e di appropriati metodi molecolari. I risultati ottenuti nel nostro studio indicano che alcune infezioni da *Po* possono essere non diagnosticate non solo dall'esame microscopico ma anche da alcuni saggi di PCR aventi come bersaglio il gene 18S-rDNA a causa della presenza di un polimorfismo genetico presente in questa regione.