

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 designata 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.