

M071**IMPORTANZA DELLA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER ALLONTANARE SOSTANZE INIBENTI L'AMPLIFICAZIONE UTILIZZANDO IL "MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DIRECT TEST"**

Riva R., Carcheri M., Ciacci P., Graziani A., Lacitignola G., Mentasti M., Pastorino I., Ventura A., Zanin C., Capuzzo R..

Laboratorio Chimico Clinico e Microbiologico -
Az. Ospedaliera "Villa Scassi" - Genova

Obiettivi

Per evitare falsi negativi nei test di amplificazione se presenti inibitori occorrerebbe un controllo interno di amplificazione. Pensiamo che in assenza di questo un trattamento del campione accurato possa eliminare preventivamente gli inibitori.

Metodi

Nel nostro laboratorio usiamo dal 1994 il: "Mycobacterium tuberculosis Direct Test" (MTD test, Gen-Probe), riformulato nel 1997 per aumentarne la sensibilità, con volume campione passato da 100 a 450 ml., conseguentemente maggiore sensibilità ad eventuali inibitori.

Riscontrato questo fatto nei primi mesi d'uso dell'MTD test II allorché Aspirati Bronchiali e Versamenti Pleurici, abitualmente addizionati di un prodotto commerciale anticoagulante e lisante, hanno fornito amplificazione negativa contro esami microscopico e colturali positivi.

Controllata ogni fase di preparazione campione ed esecuzione test, verificata corrispondenza tra amplificazione negativa e presenza del prodotto, ne abbiamo controllato i singoli costituenti.

Abbiamo verificato che la presenza di 153 mg/ml di Sodiopolyanetosulfonato inibisce l'amplificazione. Solo ripetuti ed abbondanti lavaggi del pellet hanno permesso di superare il problema.

Sostituito il prodotto con un altro, verificato con il produttore, abbiamo utilizzato l'esperienza per migliorare il protocollo di preparazione dei campioni onde eliminare preventivamente eventuali inibitori.

Risultati

Partendo dal pretrattamento raccomandato (CDC); per campioni fluidi (urina, liquido seminale, pus, liquor, versamento pleurico e peritoneale) procediamo a 2 lavaggi supplementari con 40 ml di H₂O distillata prima della decontaminazione con N-A-L-C e NaOH 2% per 15 minuti, per materiali da fluidificare o omogeneizzare i 2 lavaggi sono effettuati sul pellet, dopo neutralizzazione con tampone fosfato, con 40 ml dello stesso.

Esaminando i risultati di nove anni di attività su oltre 2700 campioni sottoposti a MTD test si ha una elevatissima correlazione tra questo e gli esami colturali.

Conclusioni

Le precauzioni adottate nel trattamento dei campioni dei materiali da sottoporre ad amplificazione sembrerebbero garantire la possibilità di applicare tale test anche a materiali con eventuali inibitori.

M072**VALUTAZIONE DI UNA REAL-TIME PCR PER LA QUANTIZZAZIONE VIREMICA DELL'HCV RNA**

Caldarelli-Stefano R., Panzeri M.P.*, Cambiè G.*, Molina V.

Laboratorio Analisi, sez. Diagnostica Molecolare, CAM, Monza (Mi) - Laboratorio Biologia Molecolare, Centro Trasfusionale, Ospedale di Lodi.

La determinazione del livello sierico dell'RNA del virus dell'epatite C (HCV) risulta di estrema importanza nella valutazione dell'effetto della terapia nei pazienti in trattamento.

Dai dati presenti in letteratura, la real-time PCR si dimostra una tecnica sensibile e accurata per la quantizzazione degli acidi nucleici, ma è ancora poco utilizzata nei laboratori analisi per determinare l'RNA dell'HCV per diversi motivi, tra i quali la necessità di personale specializzato. Inoltre, i kit commerciali non sono ancora ampiamente diffusi ed in alternativa vengono utilizzati essenzialmente il sistema branched-DNA (Bayer) o Amplicor monitor (Roche Diagnostics).

Il nostro laboratorio ha messo a punto una metodica in real-time per determinare la carica viremica dell'HCV RNA nel plasma o nel siero, in cui viene utilizzato il colorante SYBR Green come fluoroforo. Sono stati disegnati due primers nella regione conservata 5' non codificante, in modo da poter rilevare tutti i diversi genotipi. Sono stati analizzati campioni di plasma provenienti dalla seroteca del Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Lodi, in cui era stata determinata la carica viremica utilizzando la metodica branched-DNA.

Come standard di riferimento è stato utilizzato uno standard internazionale di 10⁶ UI/ml diluito più volte per costruire una curva, con una concentrazione finale di 102 UI/ml. Le reazioni sono state verificate per mezzo delle curve di melting. Il confronto tra le due metodiche, branched-DNA e real-time PCR ha dimostrato risultati non completamente paragonabili fra loro, suggerendo che il valore di HCV RNA di un campione può differire a seconda del procedimento impiegato, indicando che il laboratorio deve sempre dare un'indicazione relativa al metodo di determinazione utilizzato, in modo che il clinico possa valutare il risultato nel corso del monitoraggio dei pazienti.

M073**CERTIFICAZIONE "EVOLUTA" DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA: UN IMPORTANTE OBIETTIVO RAGGIUNTO E DA CONSOLIDARE**

¹Venturelli C., ²Mantovani G., ³Baraghini G.F., ¹Rumpianesi F.

¹Laboratorio di Microbiologia e Virologia,

²Ufficio Qualità, Azienda Ospedaliera Policlinico, Via del Pozzo 71, 41100 Modena

Il nostro laboratorio ha intrapreso il percorso per lo sviluppo e la realizzazione di un Sistema Qualità nel 1998. L'obiettivo era l'adeguamento ai requisiti dell'accreditamento istituzionale Regionale (D.Lgs. 229 e 517) e nel caso se ne creassero le condizioni la sua certificazione secondo la normativa UNI EN ISO 9002.

Tutto questo si è sviluppato con il supporto dell'Ufficio Qualità dell'Azienda che ci propose di partecipare ad una sperimentazione per giungere ad una Certificazione