

**CONFRONTO TRA METODI DI ESTRAZIONE DELL'RNA DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX IN CAMPIONI CLINICI**

O. Butera<sup>1</sup>, A. Piscini<sup>1</sup>, A. Mazzarelli<sup>1</sup>, N. Arduini<sup>1</sup>, A. Vulcano<sup>1</sup>, S. D'arezzo<sup>1</sup>, C. Venditti<sup>1</sup>, A. Di Caro<sup>1</sup>, M.G. Paglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Microbiologia e Banca Biologica, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani", IRCCS, Roma, Italia

**INTRODUZIONE**

Nel laboratorio di Microbiologia si utilizzano test molecolari per la diagnosi rapida di specie batteriche a lenta crescita come Mycobacterium tuberculosis complex (MTC). I diversi saggi molecolari, che si basano sull'amplificazione del DNA o dell'RNA di MTC, sono dotati di elevata sensibilità e specificità e forniscono risultati in poche ore. Nel nostro laboratorio è stato adottato il test molecolare TRC (transcription-reverse transcription concerted reaction) Rapid M.TB (Tosoh), che amplifica l'RNA di MTC in campioni clinici sia respiratori che extra-polmonari. Il test è manuale e quantitativo. L'estrazione dell'RNA, eseguita secondo le istruzioni della ditta produttrice, prevede: (i) pretrattamento del campione con NALC-NaOH (decontaminazione), (ii) riscaldamento a 70°C in presenza di surfactante (solubilizzazione degli inibitori), (iii) trattamento con microbiglie di zirconio in sonificatore (distruzione delle pareti cellulari) e (iv) centrifugazione (allontanamento dei residui cellulari). Scopo dello studio è stato quello di valutare l'efficienza di un secondo metodo di estrazione e purificazione dell'RNA di MTC utilizzando in parallelo colonne con membrana di silice (RNeasy mini kit, Qiagen).

**METODI**

33 campioni respiratori consecutivi sono stati suddivisi in due aliquote e sottoposti separatamente ai due metodi di estrazione dell'RNA. Il protocollo fornito dalla ditta Qiagen è stato modificato con l'aggiunta di un pretrattamento del campione con lisozima a caldo. Successivamente l'aggiunta di un tampone di lisi addizionato con  $\beta$ -mercaptoetanolo ha completato la lisi cellulare. Il campione così trattato è stato trasferito su colonna, dove l'RNA è rimasto legato alla membrana di silice per l'aggiunta di tamponi selettivi. Prodotti contaminanti e/o inibitori eventualmente legati alla membrana sono stati rimossi da lavaggi con tamponi appropriati e centrifugazione. In fine tutto l'RNA legato alla membrana della colonna è stato rimosso con acqua "RNase free" e centrifugazione.

**RISULTATI**

Tutti gli RNA estratti con i due diversi metodi sono stati amplificati e rilevati con il sistema TRCRapid M.TB-160 (Tosoh). In 24/33 campioni non veniva osservato l'RNA di MTC, mentre 9/33 risultavano positivi con tempi di comparsa dell'acido nucleico simili per entrambi i metodi.

**CONCLUSIONI**

Il metodo di estrazione dell'RNA di MTB in studio, che utilizza colonne con membrana di silice, si è dimostrato ugualmente efficiente rispetto a quello fornito nel kit TRCRapid M.TB. Infatti l'RNA estratto era di buona qualità per la mancanza di inibitori e in quantità simile essendo i tempi di comparsa dell'acido nucleico sovrapponibili nei campioni positivi. Inoltre il sistema di estrazione dell'RNA su colonna, a differenza del TRCRapid M.TB, è automatizzabile e questo può rendere la procedura più veloce e sicura, minimizzando il rischio di errori da parte dell'operatore.