

STANDARDIZZAZIONE DEL PRETRATTAMENTO DELLE FECI IN BIOLOGIA MOLECOLARE

S.M.I. Malandrini¹, M. Raggi¹, M. Brenna¹, A. Di Staso¹, G. Gandini¹, M. Manenti¹, F. Mariani¹, E. Ponti¹, M. Arosio¹, G. Mussa¹, A. Cavallero¹

¹ASST-Monza – Ospedale San Gerardo – S.C. Microbiologia e Virologia

INTRODUZIONE

La gestione preanalitica del campione fecale ha sempre posto grandi problemi di standardizzazione a causa della natura polimorfa del materiale stesso, della sua vischiosità, del contenuto di acqua e di acidi grassi che condizionano sensibilmente la sua solubilità in acqua. In particolare i test in biologia molecolare per la determinazione della carica virale di virus opportunisti gastrointestinali possono essere fortemente influenzati da un non corretto pretrattamento del campione o da variazioni anche minime della massa del campione processato. Inoltre, per questioni di praticità e rapidità, molto spesso ci si affida a sistemi empirici e soggettivi per selezionare la quantità di campione da pretrattare, come ad esempio l'utilizzo di anse calibrate.

Obiettivo del presente lavoro è valutare l'impatto di un metodo standardizzato di pretrattamento del campione fecale, nello specifico lo Stool Preprocessing Device (SPD) di BioMérieux, rispetto al metodo empirico in uso presso il laboratorio.

METODI

Sono stati processati in doppio 24 campioni di feci per la ricerca di Adenovirus. I campioni, prima dell'estrazione degli acidi nucleici con EasyMag (BioMérieux) sono stati pretrattati come descritto di seguito.

Pre-trattamento di routine: si preleva una piccola quantità di feci con ansa calibrata e si stempera in 1mL di fisiologica. Dopo miscelazione tramite vortex, si centrifuga a 3000 rpm per 10'. Per l'estrazione degli acidi nucleici si recupera tutto il surnatante che, di solito, è poco meno di 1 mL.

Stool Preprocessing Device (BioMérieux): il kit fornisce un flacone dotato di tappo filtrante. La raccolta del campione può avvenire con il cucchiaino fornito, da riempire raso di feci (circa 200 mg), oppure, in caso di feci liquide, usando una pipetta che preleva 200ul di materiale. Il flacone contiene biglie di vetro che ottimizzano l'omogeneizzazione mediante semplice vorticazione del contenuto per qualche secondo. Il tappo filtrante consente di recuperare facilmente un filtrato chiarificato che può essere immediatamente processato dopo ulteriore breve vorticazione.

RISULTATI

I ventiquattro campioni di feci analizzati in doppio sia con metodo empirico sia con metodo standardizzato SPD non hanno dimostrato differenze significative quando si effettua valutazione della carica virale di Adenovirus. La concordanza tra i due metodi, calcolata come differenza dei risultati <0.5Log, è risultata del 100%.

CONCLUSIONI

I risultati dei test effettuati sui campioni pretrattati con i due metodi sono sostanzialmente sovrapponibili, tuttavia l'utilizzo di SPD ha il vantaggio di standardizzare l'inoculo del campione nel dispositivo, garantendo una maggiore uniformità nella massa di campione processato rispetto al metodo empirico. Inoltre il tempo di preparazione del campione risulta abbreviato rispetto al metodo empirico in uso, poiché non è prevista alcuna centrifugazione ma solo brevi intervalli di vorticazione del flacone.