

138

RAPIDA ED ACCURATA DEFINIZIONE Eziologica mediante REAL TIME PCR IN UN GRAVE CASO DI POLMONITE.

Grimaldi M., Falca M., Durante Mangoni E., Di Cecio M., Utilli R., Smeraglia R.

U.O.C. Microbiologia e Virologia
 Direttore: Prof. R. Smeraglia
 A.O.R.N. V. Monaldi- Napoli

Introduzione. Una diagnosi microbiologica rapida consente di instaurare immediatamente un trattamento specifico e migliorare la prognosi nelle polmoniti. Il nostro laboratorio ha implementato una metodologia diagnostica basata sulla PCR *real-time* che consente di rilevare la presenza di 8 diversi patogeni respiratori in 6 ore.

Caso clinico e metodi. Un giovane di 27 anni con tosse secca, ipossiemia e stato settico non responsivo alla terapia di prima linea, per la presenza di polmonite basale destra all'rx, viene ricoverato e sottoposto a tampone faringeo profondo. Il campione è stato testato per i principali patogeni respiratori utilizzando il Light Cycler RT-PCR (Roche), che combina un termociclatore e un sistema di rilevazione, con sedute di PCR *real-time on line* in un sistema chiuso senza passaggi post-PCR, variabilità e rischi di contaminazione. Durante la fase esponenziale della PCR, ad ogni ciclo, due sonde specifiche marcate con fluorofori (FRET) si appaiano alla sequenza target insieme ai primers: ciò risulta nell'emissione di fluorescenza in quantità proporzionale all'amplificato. Inoltre, la fluorescenza aumenta con l'aumento della quantità di DNA/RNA target presente nel campione.

Ogni test ha incluso controlli positivi e negativi. Gli acidi nucleici sono stati estratti utilizzando l'High Pure Viral Nucleic Acid (Roche). L'RNA è stato retrotrascritto (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche) per la determinazione dei virus Respiratorio Sinciziale, Parainfluenzale I,II,III, e Influenza A. In parallelo, è stata eseguita l'amplificazione del DNA con hot start Taq DNA polymerase del LightCyclerFastStart RNA Master Hybridization Probes (Roche) per Legionella e Mycoplasma Pneumoniae. Infine, è stata eseguita l'amplificazione del cDNA dei suddetti virus. La PCR è risultata positiva per Mycoplasma pneumoniae.

Conclusioni. L'utilizzo della PCR *real-time* ci ha consentito di pervenire ad una diagnosi etiologica in appena 4 ore. Il trattamento specifico con azitromicina, prontamente iniziato, ha determinato la rapida e completa guarigione del paziente.

139

VALUTAZIONE DI DUE METODI PER LA RICERCA DEL DNA DI Chlamydia t.

Leone R.A., Minchella P., Nisticò S., Potente G.I., Borelli A., Caruso V., Piccoli S., Carlei M.I., Caruso D., Camerino M., Piccoli M., Cerminara M.T., Mustaro C., Gagliardi B., Nicolazzo A., Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, Presidio Ospedaliero, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Introduzione. Le infezioni urogenitali da Chlamydia trachomatis (Ct), infezioni batteriche sessualmente trasmesse, frequenti nei paesi industrializzati e prevalenti tra giovani adulti, costituiscono un problema di salute pubblica in quanto, per la maggior parte asintomatiche, possono dare complicazioni le cui sequele spesso compromettono la fertilità, soprattutto nelle donne. Il complesso ciclo biologico della Ct in cui si alternano due entità morfologiche e funzionali, corpo elementare extracellulare (infettante) e corpo reticolare intracellulare (forma replicativa), può spiegare il decorso con sintomatologia attenuata o assente. Una diagnosi precoce ed un opportuno trattamento antibiotico sono d'importanza critica per prevenire sia complicanze che trasmissione dell'infezione. Per la diagnosi diretta di laboratorio possono essere utilizzate tecniche diverse (IF, EIA, NAAT, colture cellulari) che differiscono in sensibilità e specificità. Per molti anni il metodo colturale è stato considerato il test di scelta; attualmente sono considerati "gold standard" i tests di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT), come Polymerase Chain Reaction (PCR), Strand Displacement Amplification (SDA), Ligase Chain Reaction (LCR) o Transcription-Mediated Amplification (TMA).

Scopo. Valutare due tests (PCR-Real Time e SDA) basati sulla ricerca del DNA di un plasmide criptico della Chlamydia t., presente in numero di copie da 7 a 10 per corpo elementare.

Materiali e metodi. Sono stati testati in doppio n. 245 campioni (n. 205 Tamponi endocervicali e n. 40 T. uretrali maschili), di pazienti sintomatici e non, alcuni dei quali con problemi di fertilità, afferenti nel periodo marzo-settembre 2006. Sono stati utilizzati il kit Chlamydia tr. Q-PCR Alert (metodo quantitativo PCR Real-time, ditta Nanogen) ed il kit BD ProbeTec ET Chlamydia t. (metodo qualitativo SDA, ditta BD).

Risultati. Dei 245 campioni sono risultati negativi con entrambi i metodi n. 236 (96,3 %); dei 9 risultati positivi con PCR, n. 4 sono risultati anche positivi con SDA mentre n. 5 sono risultati discordanti.

		SDA		
		-	+	
PCR-RT	Camp.			
	-	236	0	236
	+	5	4	9
		241	4	245

Discussione e Conclusioni. I risultati dimostrano una elevata concordanza (97,96 %); la discordanza (2,04 %) riguarda n. 5 campioni risultati negativi con metodo SDA e positivi con metodo PCR-RT, dei quali solo uno con un titolo DNA-Chlamydia t. significativo.