

Diagnosi di polmonite atipica mediante multiplex PCR

Federico Piana, Alessandra Riccabone, Loredana Frisicale, Maria Quaranta, Manuela Boetto, Giovanna Marchiaro, Daniela Maria Cirillo

UOA Microbiologia ASO San Giovanni Battista c.so Bramante 88 - 10126 Torino

Gli agenti eziologici più frequenti delle polmoniti atipiche comunitarie sono *L.pneumophila*, *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae*. Questi ultimi due microrganismi causano patologie con identiche caratteristiche cliniche e radiologiche e diventa importante per il clinico avere una diagnosi rapida per instaurare una terapia adeguata.

L.pneumophila è l'agente eziologico della legionellosi, patologia in cui i sintomi della polmonite atipica sono accompagnati da una sintomatologia gastrointestinale, iponatremia e alterato stato mentale (2).

La diagnosi eziologica di polmonite sia nosocomiale sia comunitaria è utile solo se è effettuata in tempi rapidi e, possibilmente, su campioni ottenuti senza ricorrere a metodiche invasive. Le metodiche di recente introduzione che maggiormente rispondono a tali requisiti sono, oltre alla ricerca di antigeni mediante test immunocromatografici su secrezioni respiratorie o su urina, le indagini che utilizzano tecniche di amplificazione di geni in materiali provenienti dalle alte vie respiratorie. La Multiplex PCR (Pneumotris-Amplimedical Bioline) per *L.pneumophila*, *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* è un sistema rapido e di facile esecuzione che può essere usato anche su campioni raccolti senza l'uso di tecniche invasive.

La Multiplex PCR è una nested PCR che rivela la presenza del gene della citoadesina P1 di *M.pneumoniae* come un amplicone di 186 bp (1,4) ed il gene OMP di *C.pneumoniae* (269 bp) (3). Per *L.pneumophila* il gene target è Mip (Macrophage Infectivity Potentiator). Il rilevamento dell'amplicato è eseguito su gel di agaroso (2%) in presenza di etidio bromuro. Il controllo interno per la presenza di inibitori non specifici è eseguito sui campioni negativi amplificando il gene della β -globulina.

In questo studio retrospettivo abbiamo confrontato i risultati dell'amplificazione del DNA eseguita mediante multiplex PCR con quelli ottenuti con metodi tradizionali quali il rilevamento degli anticorpi IgM per *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* e la coltura per *L.pneumophila*. È stata anche eseguita la ricerca dell'antigene urinario di Legionella. (Binax NOW® Legionella Urinary Antigen Test) (5,6).

Nel periodo di tempo compreso tra maggio 2000

e febbraio 2003, abbiamo utilizzato la multiplex PCR per la rivelazione simultanea di amplificati specifici di *L.pneumophila*, *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* su 601 materiali (332 lavaggi broncoalveolari, 109 broncoaspirati, 20 liquidi pleurici, 37 biopsie respiratorie, 15 aspirati tracheali, 86 espettorati e 2 essudati/pus) su cui è stata richiesta la ricerca di almeno uno dei tre patogeni. I campioni sono stati opportunamente diluiti ed il DNA estratto tramite termolisi alcalina (95°C per 5 minuti). Gli estratti sono stati purificati per incubazione con Extracellular Purification kit ed i surnatanti sono stati raccolti ed amplificati secondo le istruzioni della ditta produttrice (Amplimedical).

53 campioni dei 601 testati (8,8%) sono risultati positivi: 25 lavaggi broncoalveolari (8 per *C.pneumoniae*, 9 per *L.pneumophila* e 8 per *M.pneumoniae*); 11 broncoaspirati (8 per legionella e 3 per *M.pneumoniae*), 7 biopsie respiratorie (2 per *M.pneumoniae*, 1 per *C.pneumoniae* e 4 per *L.pneumophila*), 2 aspirati tracheali per *L.pneumophila*, 22 espettorati (7 per *M.pneumoniae*, 5 per *C.pneumoniae*, 1 per entrambe e 9 per *L.pneumophila*) ed 1 essudato/pus per *L.pneumophila*. Nessun liquido pleurico è risultato positivo per la ricerca di questi microrganismi.

Quando abbiamo confrontato questi risultati con quelli ottenuti mediante tecniche tradizionali, si è riscontrato che i 20 campioni positivi per *M.pneumoniae* sono stati raccolti da 19 pazienti. Da 10 di questi pazienti è stato raccolto un campione ematico per la ricerca delle IgM specifiche per questo microrganismo e in 2 casi la ricerca ha dato esito positivo (20%).

Per quanto riguarda *L.pneumophila*, il campione è stato seminato su Charcoal Yeast Agar, ma le colonie sono cresciute in 14 casi sui 33 risultati positivi all'amplificazione (42,4%). I 33 campioni provenivano da 18 pazienti e in 16 casi è stata eseguita anche la ricerca dell'antigene urinario: 2 sono risultati negativi e 14 (87,5%) positivi. La ricerca delle IgG specifiche è stata richiesta per 16 pazienti e ha dato esito positivo in 10 casi (62,5%).

In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono che se c'è un'ipotesi clinica di polmonite atipica, l'amplificazione contemporanea per la ricerca

degli acidi nucleici di *L.pneumophila*, *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* permette di ottenere risultati diagnostici in una sola giornata lavorativa.

Il confronto tra l'amplificazione e la ricerca delle IgM specifiche per *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* evidenzia che un risultato positivo della prima correla maggiormente con la situazione clinica.

L'amplificazione di una regione conservata di *L.pneumophila* con primers specifici si è dimostrata un sistema veloce, specifico e sensibile per la diagnosi di legionellosi. Deve essere eseguita con il controllo dell'inibizione ed è complementare alla ricerca dell'antigene solubile nelle urine.

BIBLIOGRAFIA.

1. Abele-Horn et al. Molecular approaches to diagnosis of Pulmonary Disease due to *M. pneumoniae*. *JCM* 1998; 36, 548-551
2. Bernstein et al. (1998). Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill
3. Boman et al.. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* Infection. *JCM* Dec 1999; 3791-3799.
4. Dorigo Zetsma et al. Molecular detection of *M. pneumoniae* in Adults with Community Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization. *JCM* Mar 2001, 1184-1186.
5. Helbig J.H. et al. JCM Clinical Utility of Urinary Antigen Detection for Diagnosis of Community-Acquired, Travel-Associated, and Nosocomial Legionnaires' Disease. *JCM* Feb. 2003. (41) 838-840.
6. Wever P. et al. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunocromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 in urine during an outbreak in the Netherlands *JCM* 2000; 2738-2739.

Daniela M. Cirillo
Ospedale San Raffaele
Emerging Bacterial Pathogens
Via Olgettina, 60 - 20132 Milano
Tel. 02-26437949
E-mail: cirillo.daniela@hsr.it