

PERFORMANCE ANALITICHE DELLA REAL TIME ED IMPIEGO DI SONDE TAQMAN PER LA DISCRIMINARE GRAM+, GRAM- E FUNGHI NELLE INFEZIONI BATTERICHE INVASIVE

L. Bianchi¹, S. Donati¹, D. Cappelli¹, M. Donati¹, R. Lari¹

¹Azienda USL Toscana Centro (Ex-Asl 3), Ospedale "S. Jacopo", U.O. Laboratorio Analisi, via Ciliegiole, Pistoia.

INTRODUZIONE

Nelle infezioni invasive l'identificazione precoce dell'agente eziologico è fondamentale per guidare la scelta della terapia antimicrobica; in particolar modo la rilevazione del sito primario di infezione (MSPD) è necessaria entro le prime 12 ore dalla diagnosi (Dellinger RP et al., 2013). L'attuale gold standard è l'emocoltura (EC) seguita dall'esame batterioscopico Gram (BG), quest'ultimo se pur rapido è poco sensibile ($>10^4$ CFU/ml), mentre l'EC assieme ad una scarsa sensibilità mostra un elevato tempo di positivizzazione e di conseguenza una identificazione dell'agente eziologico e delle antibiotico resistenze anche dopo 36-72h (Zucol et al., 2006). È stata valutata l'applicabilità di una metodica in RealTime (RT)-PCR con sonde TaqMan testata su campioni clinici, confrontandola in termini di performance con la metodica di riferimento colturale.

METODI

La rilevazione dei patogeni è stata effettuata con metodica RT-PCR (modificata da Han et al., 2014; target: 11 Gram +; 9 Gram -; 7 Funghi) su: a- 400 campioni clinici equamente rappresentativi delle MSPD associati all'esame colturale (EC, Vitek 2 bioMérieux) per valutare sensibilità clinica e definire cut-off di negatività matrice-specifici; b- 200 isolati batterici da coltura, rappresentativi dell'epidemiologia per valutare la specificità clinica. I campioni negativi sono stati scelti dalla casistica "a". Tutti i campioni, dall'estrazione all'analisi dei risultati, hanno seguito percorsi tracciabili e automatizzati (QIAAsymphony SP/AS, QIAgility e Rotor-Gene Q, Qiagen). I dati discordanti fra RT-PCR e EC sono stati confermati con test molecolari CE-IVD, tra cui il test MT-PCR Batteriemia (NLM) con target: 7 Gram +, 7 Gram -; mecA.

RISULTATI

SENSIBILITA' CLINICA: le positività dell'EC e dell'RT-PCR sono rispettivamente del 21% e 36,9%. La sensibilità clinica per i miceti è in corso. **SPECIFICITA' CLINICA:** la specificità (concordanza) clinica fra EC e RT-PCR è del 100% per i patogeni rilevabili dalla RT-PCR. E' stata osservata una correlazione fra la carica batterica (CB) dell'EC con quella ottenuta con metodica RT-PCR (n=40): a) rare $< 10^4$ copie/ml (ciclo soglia $Ct < 27$); b) frequenti 10^4 - 10^6 ($21 < Ct < 27$); c) numerose $> 10^6$ copie/ml ($Ct \geq 21$). **SEPSI E MENINGITI.** Analizzando la MSPD dei casi di meningite e sepsi (n=25) la CB è risultata $\geq 10^5$ copie/ml ($Ct \geq 24$) fino a 10^9 ($Ct \geq 15$), ad eccezione delle matrici sangue e liquor in cui si sono osservate anche cariche $< 10^3$ copie/ml.

CONCLUSIONI

Da questo studio emerge che le caratteristiche di elevata rapidità (2h), sensibilità, specificità, completa automazione e tracciabilità della metodica RT-PCR la rendono idonea, ad integrazione e non in sostituzione degli esami batteriologici classici, a selezionare le MSPD per esami di approfondimento. Fornendo una diagnosi iniziale, seleziona i casi positivi su cui applicare pannelli batterici di identificazione e profili di farmacoresistenza specifici che permettono di rispondere, con rapidità e specificità, alle richieste dei clinici per un'appropriata scelta terapeutica volta al contenimento dei costi, delle farmacoresistenze e al miglior outcome per il paziente.