

**PNEUMOCYSTIS JIROVECI: LA DIAGNOSI MOLECOLARE**

R. Bassani<sup>4</sup>, F. Genco<sup>1</sup>, R. Maserati<sup>3</sup>, C. Cevini<sup>3</sup>, A. Bruno<sup>3</sup>, C. Omes<sup>4</sup>, F. Tamarozzi<sup>3</sup>, V. Meroni<sup>2</sup>

<sup>1</sup> SC Microbiologia e Virologia Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo Pavia

<sup>2</sup> SC Microbiologia e Virologia Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo Pavia; Dipartimento Medicina Interna e Terapia Medica Università di Pavia

<sup>3</sup> SC Microbiologia e Virologia Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo Pavia

<sup>4</sup> Centro di Procreazione Medicalmente Assistita, SC Ostetricia e Ginecologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

**INTRODUZIONE**

La polmonite nell'immunodepresso, nota come *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia o PJP, è la seconda infezione fungina invasiva più frequente nel mondo (WHO 2015). Non essendo specifici i risultati clinici e radiologici, e non essendo possibile una coltura pura in vitro, la diagnosi definitiva di PJP, ad oggi, richiede ancora necessariamente il ritrovamento e l'identificazione del fungo al microscopio. Negli immunodepressi HIV negativi, ai quali oggi si riferiscono sempre più casi, la polmonite è sostenuta da un numero esiguo di individui del patogeno, rendendone quindi arduo il riscontro a vetrino.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare il possibile impiego della biologia molecolare nella diagnosi di questo patogeno, proponendo il confronto con una metodica tradizionale.

**METODI**

Presso il Dipartimento di Malattie Infettive della Fondazione IRCCS Policlinico "San Matteo" di Pavia, nel periodo compreso tra dicembre 2014 e maggio 2016, sono stati analizzati con le due tecniche 69 campioni biologici, 6 di espettorato indotto e 63 di lavaggio bronco-alveolare. Partendo dai campioni respiratori sono stati anzitutto allestiti i vetrini da utilizzare per la diagnostica di routine, colorati con blu di toluidina, e sottoposti alla ricerca microscopica delle cisti, aggregate generalmente in cluster. Il ritrovamento anche di un singolo cluster in un unico vetrino ha determinato la positività del campione. Il materiale residuo della metodica tradizionale è stato quindi sottoposto al processo di estrazione del DNA, utilizzando la piattaforma automatizzata NucliSENS easyMAG (BioMérieux, Inc. U.S.A.), e congelato a -20°C, sino all'esecuzione del test in biologia molecolare con l'utilizzo di un kit (*Pneumocystis jirovecii* kit; BIRD srl, Italy) basato sull'impiego della real time-PCR.

**RISULTATI**

L'esito dell'esame istologico e dell'indagine molecolare è stato concordante per 56 campioni (81,2% del totale), 44 negativi e 12 positivi in entrambe le tecniche. Di contro, si sono riscontrati 13 campioni (18,8%) ad esito discordante: 1 positivo soltanto all'esame istologico (con materiale residuo estremamente scarso) e 12 risultati positivi solamente all'indagine molecolare. Recuperando i dati clinici dei pazienti è stata calcolata la sensibilità relativa: rispettivamente 68,4% con l'esame istologico e 94,7% in rt-PCR. Dall'analisi statistica mediante t-test dei valori ottenuti di Ct (Cycle threshold) nei campioni risultati positivi in entrambe le metodiche, o positivi esclusivamente in rt-PCR, la differenza è risultata significativa (p-value 0,007).

**CONCLUSIONI**

In tutti i casi in cui sono stati recuperati (6 di 12), i dati clinici hanno confermato la diagnosi molecolare di PJP. Nonostante i limiti di questo studio preliminare (scarsa numerosità del campione testato, utilizzo di materiale residuo) la rt-PCR sembra chiaramente offrire numerosi vantaggi rispetto alle tecniche diagnostiche standard: possibilità di testare più campioni contemporaneamente, tempi di risposta estremamente brevi, maggiore sensibilità e facilità di utilizzo a costi contenuti, confermando ciò che emerge dalla letteratura più recente.