

VALUTAZIONE DI SISTEMA AUTOMATIZZATO IN MULTIPLEX TANDEM PCR HIGHPLEX NELLA DIAGNOSTICA DI PATOGENI GASTROENTERICI

A. Arzese², M. Screm¹, M. Scarabelli¹, E. Falanga¹, C. Scarparo¹

¹SOC Microbiologia, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata S.M. Misericordia di Udine, UD.

²SOC Microbiologia, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata S.M. Misericordia di Udine, UD. Dipartimento di Ricerche Mediche Sperimentali e Cliniche, Università di Udine, UD.

INTRODUZIONE

In questa esperienza, è stata valutata l'applicabilità del sistema automatizzato in multiplex tandem PCR (Sistema High Plex –Nuclear Laser Medicine), configurato per evidenziare contemporaneamente la presenza in un campione clinico di 15 diversi patogeni enterici (AU25039-NLM), nello screening di campioni di feci verso i protocolli diagnostici tradizionali per gastroenteriti.

METODI

In base al risultato ottenuto al protocollo standard secondo le indicazioni delle linee guida AMCLI aggiornate, sono stati selezionati 88 campioni di feci inviati in laboratorio per coprocultura, nel periodo settembre – novembre 2015, e conservati a – 20°C dopo l'analisi routinaria. I campioni sono stati sottoposti pre-trattamento con STAR Buffer (Roche, MI) e procedura di estrazione degli acidi nucleici (Magna2, Roche, MI), infine analizzati in multiplex tandem PCR con il kit per patogeni fecali (AU25039-NLM).

RISULTATI

L'esito dell'analisi con metodi colturali standard ha evidenziato 5 campioni positivi per *Salmonella* spp., 11 per *Campylobacter* spp., 3 per *Shigella flexneri*, 1 per *E.coli* Shiga-toxin 1 produttore (STEC), 1 per *Aeromonas hydrophila*, 1 per *Aeromonas sobria*, 6/88 positivi per CDI; per quanto attiene ad agenti virali 9/88 campioni sono risultati positivi per Rotavirus, 6 per Adenovirus (ICT/RDT, Medimar, MI), nessun campione positivo per ricerca Norovirus (RIDAscreen ELISA, MI). Per 45/88 campioni non è stato identificato nessun agente specifico batterico/virale. L'analisi molecolare ha evidenziato concordanza di risultati positivi per lo stesso patogeno complessivamente in 34/43 campioni esaminati (79%), e concordanza di risultati negativi in 41/43 campioni (95%). In particolare, 1/5 campioni positivi per *Salmonella* spp., 1/ 11 per *Campylobacter* spp., 1/3 per *Shigella* spp., 1 per STEC, 1 per *A. sobria* e 4/6 CDI non sono stati evidenziati dal kit (AU25039-NLM); per agenti virali i risultati ottenuti con i metodi a confronto sono stati complessivamente concordanti (96%). In aggiunta a quanto rivelato dal metodo routinario, il sistema molecolare ha evidenziato in 2 casi *Campylobacter* spp, in 2 Rotavirus e Adenovirus, in 1 caso coinfezione con *Salmonella* spp., in 1 con Adenovirus, in 1 con *Giardia duodenalis*. Il sistema multiplex PCR prevede anche l'identificazione di Astrovirus: nessun campione è risultato positivo tra quelli analizzati.

CONCLUSIONI

Il sistema automatizzato in multiplex tandem PCR (Sistema High Plex -NLM), appare agevole nell'utilizzo per modi e tempi di lavoro; i livelli di concordanza di risultati negativi appaiono soddisfacenti, mentre le divergenze di risultati ottenuti per i campioni positivi al colturale richiedono ulteriore approfondimento. Le caratteristiche intrinseche al materiale fecale sono infatti una problematica di base nell'efficacia di estrazione di acidi nucleici. L'impiego di un sistema di raccolta e pretrattamento dedicato con tamponi floccati di nuova introduzione potrebbe altresì contribuire ad ottimizzare e standardizzare questa fase del processo analitico.