P135

Micologia

VALUTAZIONE DI METODO REAL TIME PCR AUTOMATIZZATO PER LA RICERCA DI DNA ASPERGILLUS SPP.

A. Orlandi [1], C. Pozzi [1], M. Spolti [1], L. Greco [1], S.C. Uceda Renteria [1], M. Arghittu [1], G. Lunghi [1], A. Grancini [1]
[1]*Laboratorio di Analisi – Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

INTRODUZIONE

I progressi nel management di pazienti sottoposti a trapianto di midollo o di organo solido, hanno aumentato l'incidenza di malattie opportunistiche, quali le infezioni fungine invasive (IFI) caratterizzate da elevata mortalità. La buona standardizzazione ottenuta negli ultimi anni dalle tecniche molecolari ha portato alla proposta di introdurle tra i metodi per la definizione di IFI nella prossima revisione delle linee guida EORTC/MSG.
Scopo del lavoro è valutare le performances analitiche e cliniche del sistema integrato ELITe InGenius (ELITechGroup) nell'esecuzione di un test per la ricerca del DNA di Aspergillus spp in campioni di BAL e plasma

METODI

Campioni clinici certificati negativi dai metodi gold standard e materiali di QC Internazionali sono stati usati per verificare il segnale di fondo del sistema, validare i cut-off di interpretazione dei risultati e definire il limite di rilevazione della metodica molecolare. 50 campioni di BAL e 100 campioni di plasma di pazienti a rischio sono stati analizzati con il metodo molecolare, unitamente a metodi di routine (coltura e galattomannano), ai fini di valutarne sensibilità e specificità. L'analisi molecolare è stata condotta utilizzando Aspergillus ELITe MGB kit sul sistema integrato ELITe InGenius ponendo attenzione all'ottimizzazione dell'estrazione che è stata fatta precedere da un ciclo di sonicazione per aumentarne l'efficienza.

RISULTATI

Il sistema Aspergillus ELITe MGB Kit-InGenius ha rilevato un segnale ambientale inferiore rispetto a cicli effettuati con sistemi di estrazione e amplificazione combinati.
Il cut-off di negatività è risultato 300 cp/mL per il BAL e 250 cp/mL per il plasma. Il valore di LoD per BAL e plasma è risultato pari a 1 conidio/mL. Nell'analisi dei campioni clinici, il test molecolare è risultato concorde con l'esito clinico su tutti i campioni di BAL (N=50): 41/50 sono risultati negativi per DNA Aspergillus in pazienti negativi e 9/50 sono risultati positivi in casi di possibile o probabile aspergillosi. I campioni di plasma hanno mostrato assenza di segnale nel 73% dei casi, il 16% ha dato segnale inferiore a 250 copie/ml in assenza di richiami clinici e/o radiografici e l'11% ha dato un segnale superiore a 250 copie/ml (di tali pazienti si sta monitorando l'andamento clinico).

CONCLUSIONI

I nostri dati suggeriscono che un sistema come ELITe InGenius consente la standardizzazione dei test molecolari per la ricerca di Aspergillus, grazie alla limitata contaminazione ambientale e le performance diagnostiche elevate. Le prestazioni ottimali ne supportano l'applicazione diagnostica in un approccio di screening preventivo e monitoraggio frequente nei pazienti ad alto rischio di aspergillosi e l' analisi su plasma favorirebbe l'inserimento dell'Aspergillus nel pannello di patogeni universalmente riconosciuto per lo screening del trapianto.