

LE INFEZIONI FUNGINE DA FUNGHI FILAMENTOSI IN PAZIENTI EMATOLOGICI AD ALTO RISCHIO. E' UTILE LA RICERCA DI DNA FUNGINO NEL SIERO?

V. Favuzzi¹, R. Koncan², M. Ligozzi², A.R. Centonze², C. Tecchio⁴, I. Ferrarini⁴, F. Benedetti⁴, A. Sorrentino³, G. Lo Cascio³

¹Unità di Anatomia Patologica, Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università di Verona, Italia.

²Unità di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università di Verona, Italia

³Unità di Microbiologia e Virologia, Dipartimento di Patologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Italia

⁴Unità Operativa Complessa di Ematologia e Trapianto del Midollo, Dipartimento di Patologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Italia

INTRODUZIONE

Lo scopo di questo studio è stato quello di confrontare tre differenti kit diagnostici commerciali di RT-PCR nei pazienti ematologici ad alto rischio di infezioni fungine per la diagnosi precoce di aspergillosi invasiva (IA) utilizzando come campione biologico SIERO. La sensibilità di ciascun kit è stata valutata separatamente rispetto al sistema di estrazione e amplificazione.

METODI

Da gennaio a marzo 2014, sono stati analizzati 86 campioni di siero di 19 pazienti del CTMO (Centro Trapianti Midollo Osseo) e del reparto di Ematologia di Verona; i pazienti sono stati selezionati in base ai risultati ottenuti con i biomarker fungini, galattomannano (GM) e (1-3)Beta-D-glucano (BG): 59 GM negativi e 27 positivi, che al BG risultavano 58 negativi e 28 positivi. I kit diagnostici utilizzati sono i seguenti:

- Liferiver TM fungus real time PCR kit (Shanghai ZJ Bio-Tech Co) fornisce reagenti di estrazione e amplificazione.
- MycoGENIE Aspergillus fumigatus Real-Time PCR kit. L'estrazione del DNA è stata eseguita automaticamente con la soluzione AutoMag (Automated DNA Extraction-Ademtech, Pessac, Francia).
- Myconostica Myc Assay TM Aspergillus Cepheid Smartcycler serum. In questo caso l'estrazione è stata eseguita con High PCR template preparation Kit by Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Tutto le Real-Time PCR sono state eseguite su Smart Cyclyer II, software versione 3.0 (Cefeide).

RISULTATI

Per analizzare il limite di rilevamento di DNA aspergillare dei tre kit abbiamo eseguito la Real-Time PCR su diluizioni seriali di DNA di Aspergillus fumigatus in acqua, partendo da 20 ug/ul fino ad una concentrazione finale di 2×10^{-7} pg/ul. I risultati ottenuti sono stati i seguenti: Real-Time PCR Myconostica MycAssayTM ha rilevato positività fino a 2×10^{-4} pg/ul di DNA, Real-Time PCR MycoGENIE fino a 2×10^{-6} pg/ul, Real-Time PCR Liferiver TM fino a 5 pg/ul.

Riguardo ai sieri i risultati sono stati molto simili per i kit Myconostica e MycoGENIE. Più bassa sensibilità è stata evidenziata dal kit Liferiver TM. I risultati ottenuti sembrano concordare con i risultati ottenuti con i biomarcatori fungini, anche se la sensibilità della rilevazione molecolare sembra evidenziare molte più positività soprattutto in campioni GM e BG negativi.

CONCLUSIONI

Le più recenti linee guida non raccomandano alcun test molecolare per la diagnosi di IA, né tantomeno danno indicazioni sulla tipologia di campione biologico preferibile per l'allestimento della RT-PCR. Questi risultati preliminari confermano il ruolo della PCR nel percorso diagnostico dell'Aspergillosi invasiva ma non risultano ancora determinanti nella definizione certa di malattia.