

INDICATORI DI PROCESSO DELLA FASE ESTRATTIVA DI ACIDI NUCLEICI APPLICATI A MATRICI RESPIRATORIE

S. Donati¹, R. Lari¹, m. Donati¹, P. Lencioni¹, Z. Napoli¹, Z. Napoli¹, L. Bianchi¹

¹Azienda USL 3 Pistoia, Ospedale "San Jacopo", U. O. Laboratorio Analisi, Via Ciliegiole, 51100, Pistoia.

INTRODUZIONE

Introduzione. In microbiologia, il principale problema dei test molecolari è l'elevata eterogeneità dei pretrattamenti e dei metodi estrattivi applicati ad un'ampia tipologia di matrici. Nei lavori riportati in letteratura l'efficacia estrattiva è riportata in unità di misura difficilmente confrontabili fra loro e l'idoneità del prelievo respiratorio è espressa come "ml di campione" pervenuti in laboratorio. Per le matrici respiratorie l'eterogeneità della matrice è legata anche al campionamento e solo una standardizzazione della fase pre-analitica permetterà un incremento delle performance della diagnostica molecolare.

Scopi. Scopo di questo studio è stato: A) valutare l'efficacia di metodi di pretrattamento ed estrazione impiegando due indicatori di processo, il controllo interno (CI) ed il controllo di cellularità (CC) e l'aggiunta di ceppi batterici (ATCC e NCTC) a titolo noto; B) definire l'idoneità del preparato basandosi su cut-off di cellularità invece che su volume di campione.

METODI

Metodi. Casistica dello studio: 400 matrici respiratorie (MR), egualmente suddivise fra broncoaspirati (BO), lavaggi bronchiali (BAL), espettorati (ES), e liquidi biologici (LB) quali liquido pleurico e liquido ascitico, sono stati estratti su piattaforma Qiasymphony SP (Qiagen) con Virus Pathogen MIDI kit (Qiagen) e protocollo complex 400. I protocolli di pretrattamento valutati sono stati: a) digestione enzimatica con proteinasi K e lisozima; b) lisi meccanica con TissueLyser (Qiagen) e centrifugazione; c) solo lisi meccanica. Tutti gli estratti sono stati amplificati con i test molecolari CE-IVD impiegati di routine (Bianchi et al., 2015). I cut-off di cellularità sono stati definiti in base al 10° dei valori ottenuti con il test molecolare CELL CONTROL r-gene (Argene). I test statistici usati sono: chi quadrato ($p < 0,05$), intervalli di confidenza al 95%, 10° percentile.

RISULTATI

Risultati. Il protocollo B e C mostravano il minor numero di campioni inibiti rispetto al protocollo A (2% vs 15%) e la sensibilità più elevata (13% vs 9% positivi totali). Il protocollo C presentava la massima standardizzazione (± 150 vs $\pm 340\%$) in estrazioni ripetute sullo stesso campione. Il 7%, 25%, 6% e 12% di BO, BAL, ES e LB sono risultati non idonei rispetto a cut-off di cellularità definiti in base al 10° percentile (50 campioni/400). Il 7% dei campioni riestratti hanno presentato una cellularità adeguata. La positività, applicando il criterio di idoneità, passava dal 13% (52pos/400) al 19% (68 pos/350) con $p < 0,01$.

CONCLUSIONI

Conclusioni. I dati di questo studio indicano come, mediante l'impiego di indicatori di processo quali il CC e il CI, sia possibile standardizzare il processo estrattivo degli acidi nucleici incrementando: sensibilità e valore predittivo negativo dei test molecolari, applicati a matrici in cui anche il campionamento è una variabile importante. Mentre il CI permette di valutare la presenza di inibitori nel campione, il CC permette di valutare la rappresentatività del campione e di definire i cut-off di cellularità per l'idoneità del prelievo.

Bibliografia.

Bianchi L, et al. (2015). Emergency management in bacterial meningitis and sepsis: application of Real Time PCR and FilmArray Technology performed directly on cerebrospinal fluid and blood samples. *Microbiologia Medica*, 30(1).