

**APPLICAZIONE DELLA REAL TIME PCR CON IMPIEGO DI SONDE TAQMAN PER L'IDENTIFICAZIONE DI BATTERI E MICETI NEL TORRENTE CIRCOLATORIO**

L. Bianchi<sup>1</sup>, S. Donati<sup>1</sup>, P. Lencioni<sup>1</sup>, M. Niccolai<sup>1</sup>, A. Cafissi<sup>1</sup>, R. Lari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Laboratorio Analisi, Sezione Microbiologia, Ospedale S.jacopo, Pistoia

**INTRODUZIONE**

Introduzione. Le infezioni del torrente circolatorio (BSI) possono essere causate da numerosi microrganismi e rappresentano un'importante causa di mortalità specialmente nelle terapie intensive. L'applicazione di un protocollo diagnostico con integrazione fra metodiche colturali e molecolari spesso permette di dare una risposta rapida in grado di indirizzare la terapia antibiotica e antifungina con incremento del tasso di sopravvivenza.

Scopo. Scopo dello studio è stato: 1) valutare l'efficienza estrattiva di protocolli diversi e 2) analizzare l'applicabilità di una metodica di screening in Real Time PCR per rilevare batteri GRAM POS, GRAM NEG e FUNGHI direttamente su sangue

**METODI**

Metodi. Sono stati analizzati 120 campioni di sangue di pazienti: 60 con emocoltura positiva e 60 con emocoltura negativa valutate con strumento BacT/ALERT® (Biomérieux). L'efficienza della fase estrattiva è stata valutata aggiungendo a sangue in EDTA concentrazioni scalari di ceppi ATCC e/o NCTC (E. coli, S. aureus, C. albicans, S.pneumoniae, N.meningitidis, L. monocytogenes e K.pneumoniae). Su piattaforma Qiasymphony SP, sono stati messi a confronto tre protocolli estrattivi: a) senza pretrattamento, kit DNA Mini e protocollo Virus Blood; b) con pretrattamento e lisi chimica dei globuli (Ho e collaboratori, 2009); c) con pretrattamento e lisi meccanica con TissueLyser (Qiagen). Gli standard trattati con protocollo b e c e i campioni trattati con protocollo c sono stati estratti con Virus Pathogen MIDI kit (Qiagen) e protocollo complex 400. Gli estratti sono stati testati per la rilevazione di Gram +, Gram - e funghi in RealTime PCR come descritto da Han e collaboratori(2014). I test statistici impiegati sono:  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ) e coefficiente di variazione

**RISULTATI**

Risultati. Il protocollo senza pretrattamento ha una resa 10 e 5 volte inferiore rispetto al protocollo, rispettivamente, con lisi meccanica e lisi chimica. Tutti i campioni analizzati sono stati estratti quindi con il protocollo c. Il 60% dei pazienti con emocolture positive sono risultati positivi per la presenza di DNA batterico/fungino anticipando in media la diagnosi di  $36h \pm 13h$ . Nel 42% è stato possibile fare diagnosi differenziale fra Gram+, Gram- e miceti (2). Il 20 % delle emocolture negative sono risultate positive alla Real Time PCR con diagnosi differenziale nel 12% dei campioni.

**CONCLUSIONI**

Conclusioni. L'efficienza estrattiva dipende dal protocollo impiegato con una variabilità elevata tale da inficiare drasticamente i risultati diagnostici ottenuti. Da qui la necessità di protocolli standardizzati e sensibilità dichiarate confrontabili (esprese come copie/ml o UFC/ml). L'emocoltura rimane il gold standard per l'elevata sensibilità anche se un test in Real-Time PCR applicabile su sangue per la rilevazione di DNA batterico/fungino permette di fare una diagnosi più rapida ed indirizzare la terapia con una prognosi migliore per il paziente.

Bibliografia.