

**REAL-TIME PCR NELLA RICERCA DI PNEUMOCYSTIS JIROVECI: VALUTAZIONE DI UN KIT COMMERCIALE E SUO IMPIEGO ALL'INTERNO DI UN ALGORITMO DIAGNOSTICO**

G. Masciarelli<sup>1</sup>, G. Capelli<sup>1</sup>, A. Amici<sup>1</sup>, M. Castiglioni<sup>1</sup>, M. Palumbo<sup>1</sup>, A. De Nicolò<sup>1</sup>, F. Congestri<sup>1</sup>, M. Matteucci<sup>1</sup>, G. Testa<sup>1</sup>, V. Sambri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Microbiologia e Virologia, Centro Servizi Laboratorio Unico AUSL della Romagna, P.le Liberazione 60, Pievestina di Cesena, 47522 (FC)

**INTRODUZIONE**

La pneumocistosi (PJP) è ancora oggi la più comune patologia opportunistica riguardante i pazienti affetti da AIDS ma la sua incidenza è notevolmente aumentata in tutte quelle condizioni di immunodepressione che sottostanno a deficit dell'immunità cellulo-mediata. La ricerca convenzionale di *Pneumocystis jirovecii* si basa sulla dimostrazione microscopica in immunofluorescenza diretta (DFA) di cisti e trofozoiti in campioni provenienti dalle basse vie respiratorie. Tuttavia, la continua evoluzione dei saggi molecolari ha portato ad un aumento della sensibilità rispetto alle tecniche convenzionali. Questo studio ha lo scopo di comparare i risultati ottenuti utilizzando una Real-Time PCR quantitativa (qPCR) con quelli ottenuti attraverso la DFA, al fine di proporre un algoritmo diagnostico basato sull'integrazione delle due metodiche.

**METODI**

Presso la nostra U.O.C., da febbraio 2015 a settembre 2016 sono stati collezionati 167 campioni di lavaggio bronco-alveolare e bronchiolo-alveolare provenienti da pazienti con sospetta PJP. In prima analisi è stato utilizzato l'approccio in DFA (MERIFLUOR *Pneumocystis*® - MERIDIAN).

Il DNA è stato estratto con metodica automatizzata MagCore® (RBCBioscience). Gli estratti sono stati amplificati con il sistema di Real-Time PCR SmartCycler® (Cepheid®) attraverso il kit RealCycler PJIR® (PROGENIE MOLECULAR) che permette la quantizzazione del DNA di *P. jirovecii* grazie ad una curva di calibrazione preparata con il kit di standard RealCycler PJIQ® (PROGENIE MOLECULAR).

**RISULTATI**

20 campioni (12%) positivi sia al test in DFA sia alla qPCR;

22 campioni (13%) positivi alla qPCR ma negativi in DFA;

125 campioni (75%) negativi con entrambi i metodi.

Tutti i campioni positivi in DFA sono risultati positivi anche con qPCR.

Il numero di copie di DNA/ul è risultato molto più alto nei campioni positivi ad entrambe le metodiche (media: 378015 copie/ul) rispetto a quello rilevato nei campioni qPCR positivi e DFA negativi (media: 1290 copie/ul).

**CONCLUSIONI**

Nonostante l'elevata sensibilità delle metodiche di biologia molecolare, ad oggi il gold standard per la ricerca di *P. jirovecii* viene ritenuta essere l'analisi in DFA. Tenendo però conto dell'elevato valore predittivo negativo delle tecniche di Real-Time PCR, riteniamo giustificato proporre un iter diagnostico che preveda in prima analisi uno screening dei campioni in biologia molecolare, in modo da escludere i veri negativi, e successivamente, sui campioni positivi, effettuare l'analisi in DFA per confermare positività e carica infettante. L'integrazione dei due metodi permette la stesura di un referto più completo che tiene conto di entrambi i risultati che possono essere interpretati nel contesto di un quadro clinico generale per una migliore gestione del paziente.