

REAL-TIME PCR PER L'IDENTIFICAZIONE PRECOCE DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA DA SECREZIONI RESPIRATORIE DI PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

M. Rossitto¹, V. Tuccio Guarna Assanti¹, G. Linardos¹, N. Essa¹, A.L. Montemari¹, P.D. Ristagno¹, G. Ricciotti¹, E.V. Fiscarelli¹

¹UOS Microbiologia della Fibrosi Cistica, Dipartimento dei laboratori, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

INTRODUZIONE

Pseudomonas aeruginosa (PA) è il principale patogeno che colonizza il polmone con fibrosi cistica (FC) e la sua acquisizione si associa ad un aumento significativo di morbidità e mortalità. Per prevenire la colonizzazione cronica da PA è necessario un intervento terapeutico aggressivo fin dalla prima acquisizione. Pertanto metodi sensibili e specifici sono fondamentali per l'identificazione precoce di PA dalle secrezioni respiratorie. Scopo di questo studio è stata la definizione di un protocollo di real-time PCR (qPCR) per l'individuazione di PA direttamente da campione biologico, in comparazione con le tradizionali tecniche colturali.

METODI

Sono stati esaminati 378 campioni respiratori di 66 pazienti FC con coltura negativa per PA: in particolare, 31 pazienti non erano mai stati infettati da PA, 35 avevano apparentemente eliminato il patogeno a seguito di terapia eradicante. Il DNA batterico, estratto utilizzando l'EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen), è stato sottoposto a qPCR con StepOne (Applied Biosystem). Tre diversi set di primer con target molecolari differenti sono stati utilizzati per migliorare la sensibilità e la specificità del metodo. In particolare, un primo screening sui campioni è stato effettuato con primer e probe che amplificano il gene *oprL* di PA. I campioni risultati positivi ad *oprL* sono stati confermati, e quantificati, con primer che amplificano i geni *gyrB* e *ecfX*. Gli stessi campioni sono stati utilizzati per un esame colturale secondo le procedure standard del laboratorio.

RISULTATI

Sono risultati positivi alla qPCR 39 (10.3%) campioni respiratori, di cui 20 (51.2 %) di pazienti mai colonizzati da PA e 19 (48.8%) di pazienti sottoposti in precedenza a terapia eradicante con apparente bonifica microbiologica. In questo sub-set di pazienti, sono stati confrontati tramite PFGE i profili genetici dei ceppi responsabili della prima infezione, ritenuti eradicati, e dei ceppi ricomparsi successivamente in coltura. In alcuni casi, la tecnica molecolare ha dimostrato l'isogenicità dei suddetti isolati, suggerendo una mancata eradicazione.

CONCLUSIONI

Dati preliminari sostengono che la qPCR permette di individuare il batterio in media 5.5 mesi (range 1-11 mesi) prima della sua comparsa in coltura, proponendosi come una metodica specifica e sensibile sia per la rilevazione di PA di nuova acquisizione, sia per la valutazione dell'efficacia della terapia eradicante.

Sono necessari ulteriori studi per definire l'impatto clinico della qPCR nel management dei pazienti con fibrosi cistica.