



Confronto tra due metodi RealTime PCR nelle infezioni respiratorie da *Cp. pneumoniae* e *M. pneumoniae*

Shurdhi A.¹, Pignanelli S.¹, Delucca F.¹, Savegnago F.¹, Donati M.¹, Cevenini R.¹

¹Sez. di Microbiologia Policlinico S. Orsola-Malpighi - via Massarenti 9, 40138 Bologna



Introduzione

Cp. pneumoniae (*Cp*) e *M. pneumoniae* (*Mp*) rappresentano frequenti cause di infezioni respiratorie acquisite in comunità. Negli Stati Uniti l'incidenza delle polmoniti causate da questi patogeni è del 20-40%, che determinano l'ospedalizzazione di 600.000 pazienti all'anno^[1,2].

La diagnosi di questi patogeni viene solitamente effettuata attraverso tecniche dirette (colturali e NAAT) e indirette (sierologiche) che differiscono per sensibilità, specificità e per i tempi di refertazione. In particolare tecniche di biologia molecolare come la RealTime PCR (RT-PCR) mostrano una più elevata specificità e sensibilità nel rilevare *Cp* ed *Mp* rispetto alle altre tecniche diagnostiche.

In questo lavoro sono state confrontate due tecniche di RT-PCR (LightCycler RealTime PCR Roche e affigene Cp/Mp tracer Alfa Wassermann Diagnostics) per l'identificazione di *Cp* ed *Mp* in campioni biologici.

Metodi 1

Nel 2007 sono stati studiati 50 campioni biologici (AFN e BAL), provenienti da pazienti ospedalizzati per sintomatologia respiratoria acuta. Dopo la preparazione del pellet cellulare, i campioni sono stati estratti, utilizzando NucliSens easyMag Biomerieux, secondo le istruzioni del produttore.

Metodi 2

Amplificazione con tecnica LightCycler RealTime PCR Roche

Il materiale estratto è stato amplificato con metodica RT-PCR utilizzando lo strumento LightCycler II con il kit *Mycoplasma pneumoniae* LCSet e *Chlamydia pneumoniae* LCSet (TIB molbiol per Roche). La metodica prevedeva l'utilizzo di capillari di vetro all'interno dei quali venivano messi a contatto 15 µl di master mix e 5 µl di DNA estratto dal campione (Fig. 1). La miscela di amplificazione è stata preparata aggiungendo a primers e probes l'enzima hot start Taq DNA polymerase presente nel LightCycler FastStart DNA Master PLUS Hybridization Probes (Roche). Durante la reazione un frammento genomico (target gene) dell'agente patogeno (polymorphic membrane protein G family di 140bp per *Cp* e cytoadhesin P1 gene di 342bp per *Mp*) è stato amplificato usando sonde FRET e primers specifici^[3] (Fig. 2) e rilevato con la fluorescenza generata dalla coppia di sonde specifiche di ibridazione. La rivelazione è stata effettuata mediante lettura in tempo reale della fluorescenza emessa dai prodotti di amplificazione, direttamente nel capillare con un limite di rilevamento di 5 equivalenti genomici/reazione PCR nei campioni biologici per entrambi gli agenti patogeni. La lettura avviene ad ogni ciclo su sei canali, utilizzando sonde marcate con fluorofori diversi (es. LC-Red 640) (Fig. 3). L'utilizzo di questo test è previsto per fini di ricerca scientifica.



Fig. 1 Materiali e Metodi del test

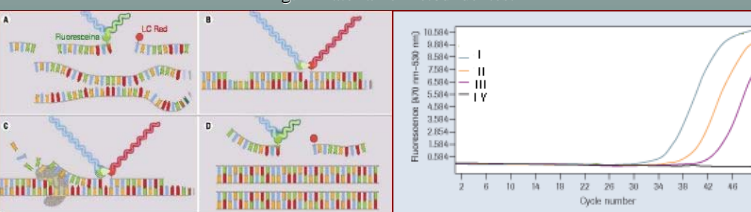


Fig. 2 Il principio delle sonde FRET

Fig. 3 Curve di amplificazione

Tecnica affigene Cp/Mp tracer Alfa Wassermann Diagnostic

Il materiale estratto è stato amplificato con tecnica RT-PCR multiplex che permette il rilevamento simultaneo di *Cp* (Hex) e *Mp* (Fam) e di un Controllo Interno DNA IC Carrier (Rox), certificata CE-IVD, utilizzando il sistema Mx3000P Stratagene per l'amplificazione con il kit affigene Cp/Mp tracer, che permette l'analisi dei risultati, impiegando il software affigene analysis (Fig. 4). Il kit affigene Cp/Mp tracer prevede l'utilizzo di primers scorpions^[4] che agiscono attraverso un meccanismo unimolecolare che potenzia il segnale e previene segnali specifici provenienti dalla reazione di amplificazione del frammento genomico (target gene) dell'agente patogeno Major Outer Membrane Protein (MOMP) per *Cp* e P1 adhesion protein per *Mp* (Fig. 5). Durante la reazione vengono impiegati strip con 8 tappi ottici e strip con 8 microtubi, all'interno dei quali vengono messi a contatto 25 µl di master mix con 25 µl di DNA estratto del campione clinico. Il limite di rilevamento nei campioni biologici (Limit of Detection, LOD) è di 3.7 equivalenti genomici/reazione PCR di *Cp* (intervallo 2.5-8.7) e di 4.2 equivalenti genomici/reazione PCR di *Mp* (intervallo 2.5-11.1). Il materiale impiegato è mono-uso (fig. 6).



Fig. 4 Materiali e Metodi del test

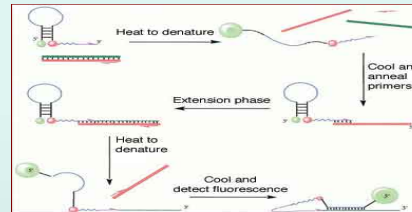


Fig. 5 Il principio delle sonde SCORPIONS

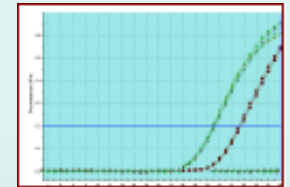


Fig. 6 Curve di amplificazione

Risultati

Benchè le due tecniche abbiano mostrato una diversa sensibilità nel rilevare la presenza del materiale genetico di *Mp* e *Cp*, in accordo, per altro con quanto indicato dai due produttori, entrambe le tecniche utilizzate in questo studio hanno mostrato risultati concordanti ad eccezione di un campione biologico, risultato positivo per *Mp* solo con il metodo RT-PCR affigene Cp/Mp tracer Alfa Wassermann Diagnostics. Tale dato è stato, per altro, confermato dalla sierologia eseguita per ricerca di anticorpi delle classi IgG e IgM anti-*Mp* con tecnica immuno-enzimatica ELISA (Novagnost™ *Mycoplasma pneumoniae* IgG e IgM, Dade Behring), evidenziando rispetto ad un precedente campione siero-conversione. (Tab. 1). Tutti i risultati ottenuti erano in accordo con il sospetto clinico di tali infezioni e nella maggior parte dei casi con la presenza di anticorpi IgG ed IgM specifici anti-*Cp* (tecnica di Microimmunofluorescenza) ed anti-*Mp* (tecnica ELISA Novagnost™ *Mycoplasma pneumoniae* IgG e IgM, Dade Behring).

Kit impiegato	Patogeni indagati			
	Cp		Mp	
Patogeni	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Roche	10	40	1	49
AlfaWassermann	10	40	2	48

Tab. 1 Risultati del confronto delle metodiche RT-PCR

Conclusioni

Entrambe le tecniche di RT-PCR studiate si sono dimostrate semplici nell'esecuzione e nell'analisi dei risultati ottenuti, dimostrandosi anche molto sensibili, quindi di grande utilità per la diagnosi laboratoristica delle infezioni respiratorie causate da *Cp* e *Mp*. In particolare la tecnica affigene Cp/Mp tracer Alfa Wassermann Diagnostic si è dimostrata di notevole applicabilità diagnostica, in quanto certificata CE-IVD, semplice nell'esecuzione (RT-PCR Multiplex) e dai costi relativamente contenuti.

Bibliografia

- 1) Atkinson T. P., Balish M. F., Waites K. B. *Fems Microbiol. Rev.* (2008)
- 2) Samransamruangki R., Jichawat S., Wachirapras W., Deeroganawong J., Sripiyayawan S., Pitrapphal N. *Jpn J. Infect. Dis.* (2008)
- 3) Geruo A., Petrucca A., Cassone A. *Mol Cell Probes.* (2003)
- 4) Thelwell N., Mellington S., Solinas A., Booth J., Brown T. *Nucleic Acids Research* (2000)