

RILEVAZIONE DELLA *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* IN CAMPIONI AMBIENTALI: UTILIZZO DELLA METODICA REAL TIME PCR COME METODO DI SCREENING DEI CAMPIONI NEGATIVI E GUIDA NELLA SCELTA DELLE PROCEDURE DA APPLICARE PER LA CONFERMA CULTURALE DEL RISULTATO

Francesca Borney¹, Joelle Bryer¹, Daniela De Lorenzi¹, Livia Mobili¹

¹ARPA Valle d'Aosta, Sezione Laboratorio, Area Operativa Biologia e Microbiologia

Saint Christophe (AO), Italia

Introduzione

Il metodo colturale ISO 11731:2017, “*Water quality – Enumeration of Legionella*”, è un metodo molto complesso (prevede la combinazione di 14 procedure e 3 diversi terreni colturali), lungo nei tempi di risposta (fino a 10 giorni per un risultato negativo) e fortemente operatore dipendente (necessaria grande esperienza sia nella manualità richiesta nei diversi passaggi, che nella capacità di riconoscere le colonie caratteristiche di *Legionella*).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la possibilità di utilizzare un metodo analitico molecolare, basato sulla PCR *real time*, il metodo ISO/TS 12869:2012, aggiornato ad aprile nella versione 2019 senza sostanziali modifiche. Tale metodo è stato accreditato, nel nostro laboratorio, come *screening* qualitativo, con lo scopo di discriminare velocemente i campioni positivi da quelli negativi, ottimizzando tempi di risposta e risorse, come già previsto nella microbiologia alimentare per alcuni patogeni (Reg. CE 2073/2005).

Materiali e metodi

Sono stati analizzati oltre 160 campioni naturali o contaminati in laboratorio, con la metodica colturale di riferimento, ISO 11731:2017 e la metodica molecolare ISO/TS 12869:2012.

La PCR *Real Time* è stata eseguita utilizzando diversi tipi di kit commerciali sia nella fase di estrazione e purificazione, che nella fase di preparazione della mix di reazione per l'amplificazione degli acidi nucleici e la rilevazione del segnale.

L'estrazione del DNA è basata su una lisi alcalina con shock termico, seguita da uno step di purificazione tramite ultrafiltrazione. Il DNA estratto è amplificato tramite PCR *real time* con l'utilizzo di *primers* specifici e di *probes* marcati con fluorofori, che emettono fluorescenza solo dopo ibridazione con l'acido nucleico. L'intensità della fluorescenza cresce proporzionalmente alla crescita dei prodotti di PCR e viene misurata direttamente, durante la fase di *annealing* dei *probes*, dal modulo lettore multicanale associato al termociclatore.

I risultati analitici sono stati elaborati in termini di accuratezza, sensibilità e specificità relative, di valore predittivo negativo e positivo, secondo le indicazioni della ISO 16140-2:2016 e del documento DT-07-DL/DS (ACCREDIA).

Risultati

Sono stati ottenuti buoni risultati di *performance*, in particolare per la rilevazione di *Legionella pneumophila*: accuratezza relativa 77%, valore predittivo negativo del 100%, valore predittivo positivo del 66%. Se si considerano, per l'elaborazione, i soli campioni contaminati in laboratorio tali valori diventano: accuratezza relativa 97%, valore predittivo negativo del 100%, valore predittivo positivo del 95%.

L'utilizzo della PCR *Real Time* permette una significativa riduzione dei tempi analitici e del tempo di risposta (meno di 24 ore per un campione negativo, contro 10 giorni del metodo colturale), oltre che del consumo di reattivi e plastica monouso.

Il ciclo soglia (Ct) a cui esce il segnale di amplificazione è in relazione al livello di contaminazione del campione, in particolare in assenza di flora interferente: tale correlazione permette di attuare una scelta efficace della procedura analitica da applicare per la conferma dei campioni positivi allo screening di PCR.

Conclusioni

I risultati ottenuti con uno dei kit testati sono buoni, e confermano la possibilità di utilizzare il metodo molecolare come *screening* dei campioni negativi, analogamente a quanto già avviene nella microbiologia alimentare.

I dati ottimi, ottenuti dai campioni artificialmente contaminati in laboratorio, suggeriscono che la discrepanza dei risultati tra le due metodiche considerate sia imputabile principalmente alla presenza di elevata flora interferente o di *Legionelle* vitali, ma non coltivabili, nei campioni ambientali.

Il fatto che la metodica molecolare non sia ancora considerata come utilizzabile di *routine* nelle Linee Guida rende difficoltosa l'interpretazione dei risultati e il loro utilizzo per eventuali azioni da intraprendere.

Corresponding Autor : Borney Francesca, f.borney@arpa.vda.it, 0165 278543