

## Diagnosi di polmonite atipica mediante multiplex PCR

**Federico Piana, Alessandra Riccabone, Loredana Frisicale, Maria Quaranta, Manuela Boetto, Giovanna Marchiaro, Daniela Maria Cirillo**

UOA Microbiologia ASO San Giovanni Battista c.so Bramante 88 - 10126 Torino

Gli agenti eziologici più frequenti delle polmoniti atipiche comunitarie sono *L.pneumophila*, *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae*. Questi ultimi due microrganismi causano patologie con identiche caratteristiche cliniche e radiologiche e diventa importante per il clinico avere una diagnosi rapida per instaurare una terapia adeguata.

*L.pneumophila* è l'agente eziologico della legionellosi, patologia in cui i sintomi della polmonite atipica sono accompagnati da una sintomatologia gastrointestinale, iponatremia e alterato stato mentale (2).

La diagnosi eziologica di polmonite sia nosocomiale sia comunitaria è utile solo se è effettuata in tempi rapidi e, possibilmente, su campioni ottenuti senza ricorrere a metodiche invasive. Le metodiche di recente introduzione che maggiormente rispondono a tali requisiti sono, oltre alla ricerca di antigeni mediante test immunocromatografici su secrezioni respiratorie o su urina, le indagini che utilizzano tecniche di amplificazione di geni in materiali provenienti dalle alte vie respiratorie. La Multiplex PCR (Pneumotris-Amplimedical Bioline) per *L.pneumophila*, *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* è un sistema rapido e di facile esecuzione che può essere usato anche su campioni raccolti senza l'uso di tecniche invasive.

La Multiplex PCR è una nested PCR che rivela la presenza del gene della citoadesina P1 di *M.pneumoniae* come un amplicone di 186 bp (1,4) ed il gene OMP di *C.pneumoniae* (269 bp) (3). Per *L.pneumophila* il gene target è Mip (Macrophage Infectivity Potentiator). Il rilevamento dell'amplicato è eseguito su gel di agaroso (2%) in presenza di etidio bromuro. Il controllo interno per la presenza di inibitori non specifici è eseguito sui campioni negativi amplificando il gene della  $\beta$ -globulina.

In questo studio retrospettivo abbiamo confrontato i risultati dell'amplificazione del DNA eseguita mediante multiplex PCR con quelli ottenuti con metodi tradizionali quali il rilevamento degli anticorpi IgM per *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* e la coltura per *L.pneumophila*. È stata anche eseguita la ricerca dell'antigene urinario di Legionella. (Binax NOW® Legionella Urinary Antigen Test) (5,6).

Nel periodo di tempo compreso tra maggio 2000

e febbraio 2003, abbiamo utilizzato la multiplex PCR per la rivelazione simultanea di amplificati specifici di *L.pneumophila*, *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* su 601 materiali (332 lavaggi broncoalveolari, 109 broncoaspirati, 20 liquidi pleurici, 37 biopsie respiratorie, 15 aspirati tracheali, 86 espettorati e 2 essudati/pus) su cui è stata richiesta la ricerca di almeno uno dei tre patogeni. I campioni sono stati opportunamente diluiti ed il DNA estratto tramite termolisi alcalina (95°C per 5 minuti). Gli estratti sono stati purificati per incubazione con Extracellular Purification kit ed i surnatanti sono stati raccolti ed amplificati secondo le istruzioni della ditta produttrice (Amplimedical).

53 campioni dei 601 testati (8,8%) sono risultati positivi: 25 lavaggi broncoalveolari (8 per *C.pneumoniae*, 9 per *L.pneumophila* e 8 per *M.pneumoniae*); 11 broncoaspirati (8 per legionella e 3 per *M.pneumoniae*), 7 biopsie respiratorie (2 per *M.pneumoniae*, 1 per *C.pneumoniae* e 4 per *L.pneumophila*), 2 aspirati tracheali per *L.pneumophila*, 22 espettorati (7 per *M.pneumoniae*, 5 per *C.pneumoniae*, 1 per entrambe e 9 per *L.pneumophila*) ed 1 essudato/pus per *L.pneumophila*. Nessun liquido pleurico è risultato positivo per la ricerca di questi microrganismi.

Quando abbiamo confrontato questi risultati con quelli ottenuti mediante tecniche tradizionali, si è riscontrato che i 20 campioni positivi per *M.pneumoniae* sono stati raccolti da 19 pazienti. Da 10 di questi pazienti è stato raccolto un campione ematico per la ricerca delle IgM specifiche per questo microrganismo e in 2 casi la ricerca ha dato esito positivo (20%).

Per quanto riguarda *L.pneumophila*, il campione è stato seminato su Charcoal Yeast Agar, ma le colonie sono cresciute in 14 casi sui 33 risultati positivi all'amplificazione (42,4%). I 33 campioni provenivano da 18 pazienti e in 16 casi è stata eseguita anche la ricerca dell'antigene urinario: 2 sono risultati negativi e 14 (87,5%) positivi. La ricerca delle IgG specifiche è stata richiesta per 16 pazienti e ha dato esito positivo in 10 casi (62,5%).

In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono che se c'è un'ipotesi clinica di polmonite atipica, l'amplificazione contemporanea per la ricerca

degli acidi nucleici di *L.pneumophila*, *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* permette di ottenere risultati diagnostici in una sola giornata lavorativa.

Il confronto tra l'amplificazione e la ricerca delle IgM specifiche per *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae* evidenzia che un risultato positivo della prima correla maggiormente con la situazione clinica.

L'amplificazione di una regione conservata di *L.pneumophila* con primers specifici si è dimostrata un sistema veloce, specifico e sensibile per la diagnosi di legionellosi. Deve essere eseguita con il controllo dell'inibizione ed è complementare alla ricerca dell'antigene solubile nelle urine.

### BIBLIOGRAFIA.

1. Abele-Horn et al. Molecular approaches to diagnosis of Pulmonary Disease due to *M. pneumoniae*. *JCM* 1998; 36, 548-551
2. Bernstein et al. (1998). Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill
3. Boman et al.. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* Infection. *JCM* Dec 1999; 3791-3799.
4. Dorigo Zetsma et al. Molecular detection of *M. pneumoniae* in Adults with Community Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization. *JCM* Mar 2001, 1184-1186.
5. Helbig J.H. et al. JCM Clinical Utility of Urinary Antigen Detection for Diagnosis of Community-Acquired, Travel-Associated, and Nosocomial Legionnaires' Disease. *JCM* Feb. 2003. (41) 838-840.
6. Wever P. et al. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunocromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 in urine during an outbreak in the Netherlands *JCM* 2000; 2738-2739.

**Daniela M. Cirillo**  
Ospedale San Raffaele  
Emerging Bacterial Pathogens  
Via Olgettina, 60 - 20132 Milano  
Tel. 02-26437949  
E-mail: [cirillo.daniela@hsr.it](mailto:cirillo.daniela@hsr.it)