

# Confronto tra due metodi molecolari nella rilevazione di virus respiratori

## Introduzione

Le infezioni delle vie respiratorie sono causa di elevata morbilità e mortalità, in particolar modo negli anziani, nei bambini e nei pazienti immunocompromessi. Il laboratorio di microbiologia clinica gioca un ruolo chiave nella diagnosi di queste infezioni. I metodi convenzionali come le colture virali implicano un elevato *Turn Around Time* (TAT) e *Hands On Time* (HOT), inoltre la complessità di queste infezioni costituisce una sfida anche utilizzando metodi molecolari, soprattutto a causa dell'alto numero di virus coinvolti. I sistemi in multiplex PCR consentono di superare i limiti dei singoli test molecolari poiché saggiavano in una o poche provette numerosi target. Inoltre, sebbene la sola positività non sia in grado di distinguere tra colonizzazione ed infezione, le informazioni fornite dalla carica virale, insieme ai riscontri clinici, possono essere di aiuto nell'identificare le infezioni.

Lo scopo del nostro studio è di confrontare le prestazioni di due multiplex real-time PCR nel rilevare infezioni virali durante la stagione invernale 2017.



Fig.2: sistema AusDiagnostics HIGH-Plex-NLM

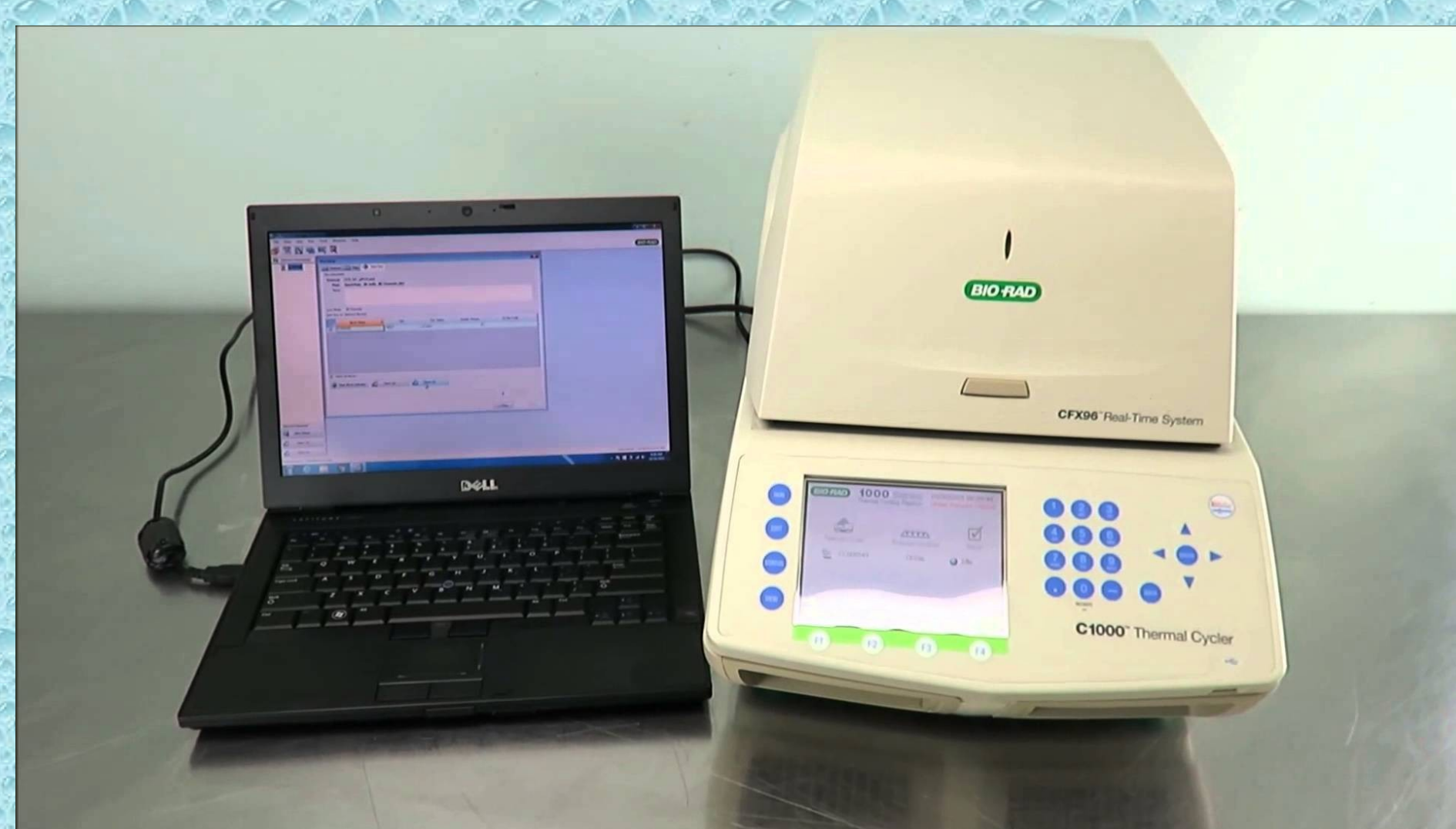


Fig.1: BioRAD CFX96

## Metodi

Sono stati analizzati in totale 84 campioni di tamponi nasali, aspirati rinofaringei e lavaggi broncoalveolari ottenuti da pazienti ricoverati all'Ospedale S. Gerardo nel periodo compreso tra gennaio e febbraio 2017.

L'estrazione degli acidi nucleici dai campioni è stata effettuata utilizzando NucliSENS easyMAG (BioMérieux) per entrambe le multiplex.

**Allplex Respiratory Panel Assays - Seegene:** HRM-PCR. La preparazione della piastra e delle mix è stata eseguita manualmente; l'amplificazione è stata eseguita secondo le specifiche del produttore con termociclatore BioRAD CFX96 (fig. 1). **Respiratory Viruses panel - AusDiagnostics:** Nested real-time PCR. Sia la preparazione della mix che quella della piastra sono state effettuate automaticamente con il sistema HIGH-Plex-NLM così come la conseguente amplificazione (fig. 2). I potenziali target rilevati con i due metodi sono gli stessi tranne per il Bocavirus che viene rilevato solo con Seegene.

## Risultati

**Seegene:** 36 campioni sono risultati positivi per 1 virus, 9 positivi per 2 o più virus, 39 negativi. L'influenza A (H3) è stato il target rilevato più frequentemente (15), seguito da RSV-A (13) e RSV-B (11).

**AusDiagnostics:** 25 campioni sono risultati positivi per 1 virus, 24 positivi per 2 o più virus, 35 negativi. RSV-A (14) è stato il virus rilevato più di frequente seguito da RSV-B e Flu-A (11). Il Coronavirus NL63 è stato rilevato in 29 campioni ma con un basso numero di copie nel 93% dei campioni.

Confrontando i risultati grezzi (Tabella 1), 34 campioni sono risultati completamente concordanti (40.5%), 40 campioni sono parzialmente concordanti (46.6%) e 10 completamente discordanti (11.9%).

Dopo aver impostato una soglia di positività al fine di eliminare i valori incerti (Tabella 2), i campioni concordanti sono 68 (81%), mentre sia i parzialmente concordanti sia i completamente discordanti sono 8 (9,5%).

Analizzando i dati di Flu A-H3 ed EV abbiamo osservato che i 5 (4+1) campioni discordanti risultati positivi con il pannello Seegene mostravano un elevato Ct (> 37), pertanto la loro carica virale era molto bassa. Inoltre anche il risultato dell'unico campione discordante per RSV rilevato da AusDiagnostics mostrava una carica virale molto bassa. Rhinovirus ed Adenovirus sono risultati discordanti solo in un campione per ciascun metodo.

Target	Seegene	AusDia
Influenza A virus (Flu A)	0	0
Influenza B virus (Flu B)	0	0
Respiratory syncytial virus A	13	14
Respiratory syncytial virus B	11	11
Flu A-H1	0	0
Flu A-H1pmd09	0	0
Flu A-H3	15	11
Adenovirus	0	1
Enterovirus	1	0
Parainfluenza virus 1 (PIV 1)	0	0
Parainfluenza virus 2 (PIV 2)	0	0
Parainfluenza virus 3 (PIV 3)	1	1
Parainfluenza virus 4 (PIV 4)	0	0
Metapneumovirus (MPV)	2	2
Bocavirus (HBoV)	1	NA
Rhinovirus (HRV)	7	6
Coronavirus NL63 (CoV NL63) <sup>o</sup>	4	9
Coronavirus 229E (CoV 229E) <sup>o</sup>	(4)	0
Coronavirus OC43 (CoV OC43)	1	2
Negativi	39	40

<sup>o</sup>Con Seegene Coronavirus NL63 e 229E sono rilevati insieme

Tabella 1: Confronto risultati grezzi

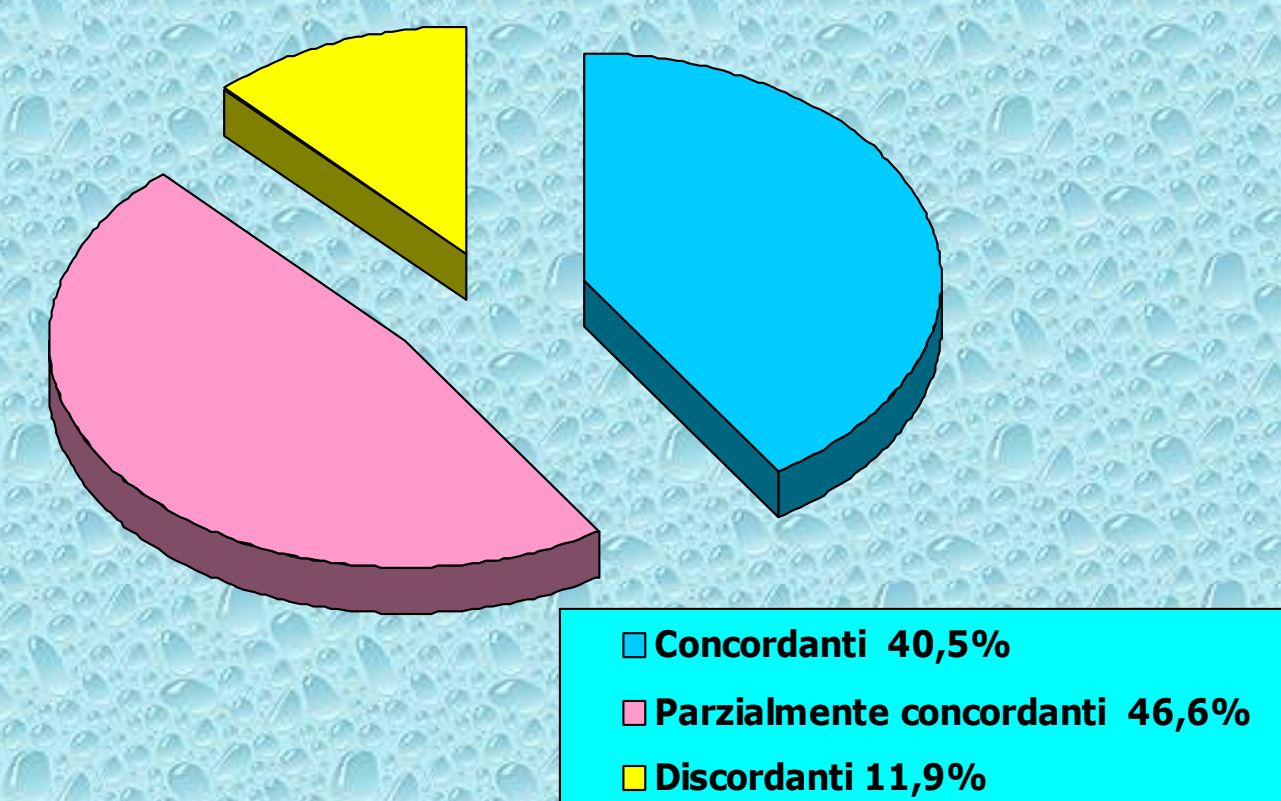


Tabella 2: confronto risultati adattato

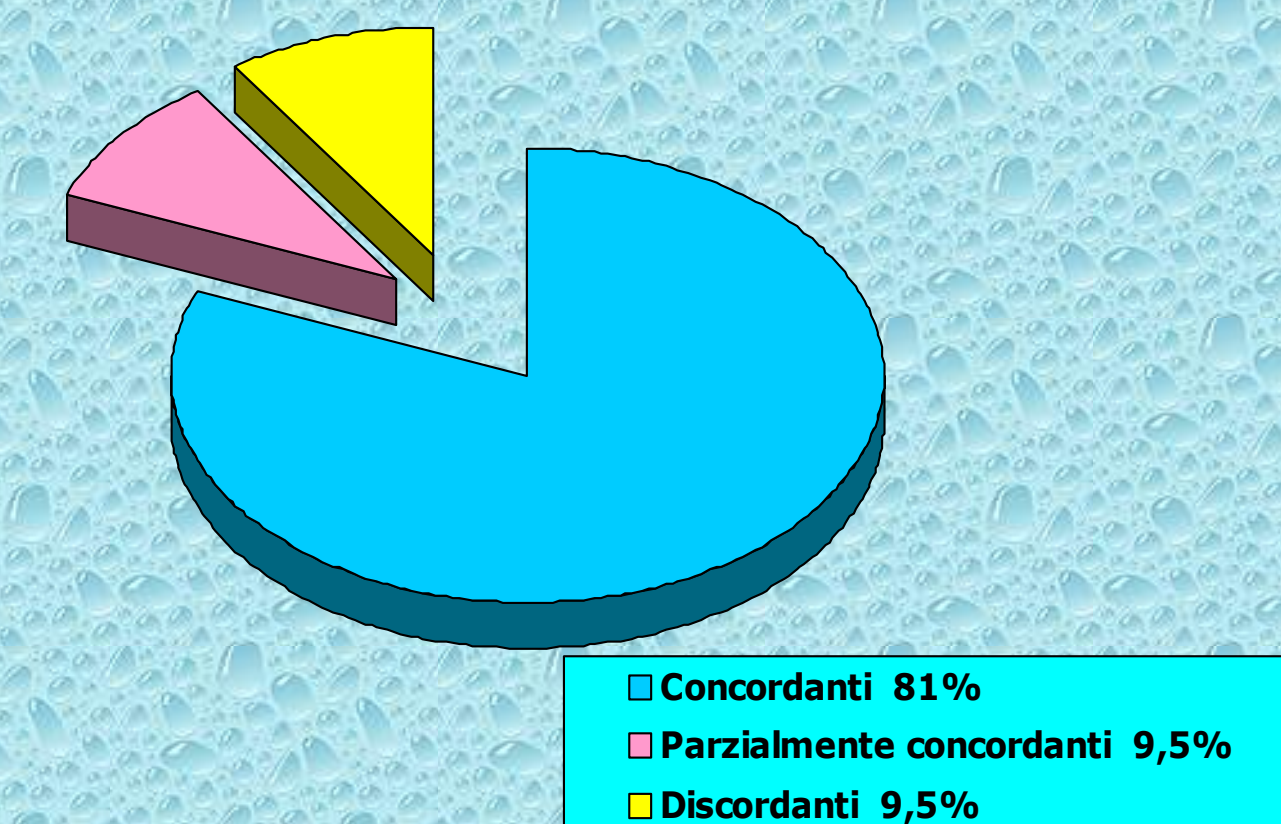


	Plate set-up	Amplification	Total
Seegene	30'	150'	180'
AusDiagnostics Nested PCR	30'+30'	60'+65'	185'

Tabella 3: TAT di entrambi i metodi, senza considerare l'estrazione

## Conclusioni

Entrambi i metodi mostrano una buona performance ed un TAT di circa 3 ore (Tabella 3) per tutti i campioni.

Il punto di forza maggiore di AusDiagnostics è l'automazione nella preparazione della piastra con un conseguente HOT più basso e minor rischio di errori e scambi di provette.

Per quanto concerne il metodo Seegene il principale punto di forza è la flessibilità poiché diversi pannelli possono essere utilizzati sulla stessa piastra e quindi test diversi possono essere eseguiti contemporaneamente.

Sebbene questi metodi siano semi-quantitativi, le differenze maggiori sono state trovate nei campioni con bassa carica virale.

In assenza di un metodo di riferimento con cui confrontarsi le basse soglie di positività di entrambi i metodi possono portare ad identificare un elevato numero di campioni positivi, pertanto è consigliabile effettuare un'analisi del significato clinico sui campioni con bassa carica virale per riconoscere le vere infezioni.