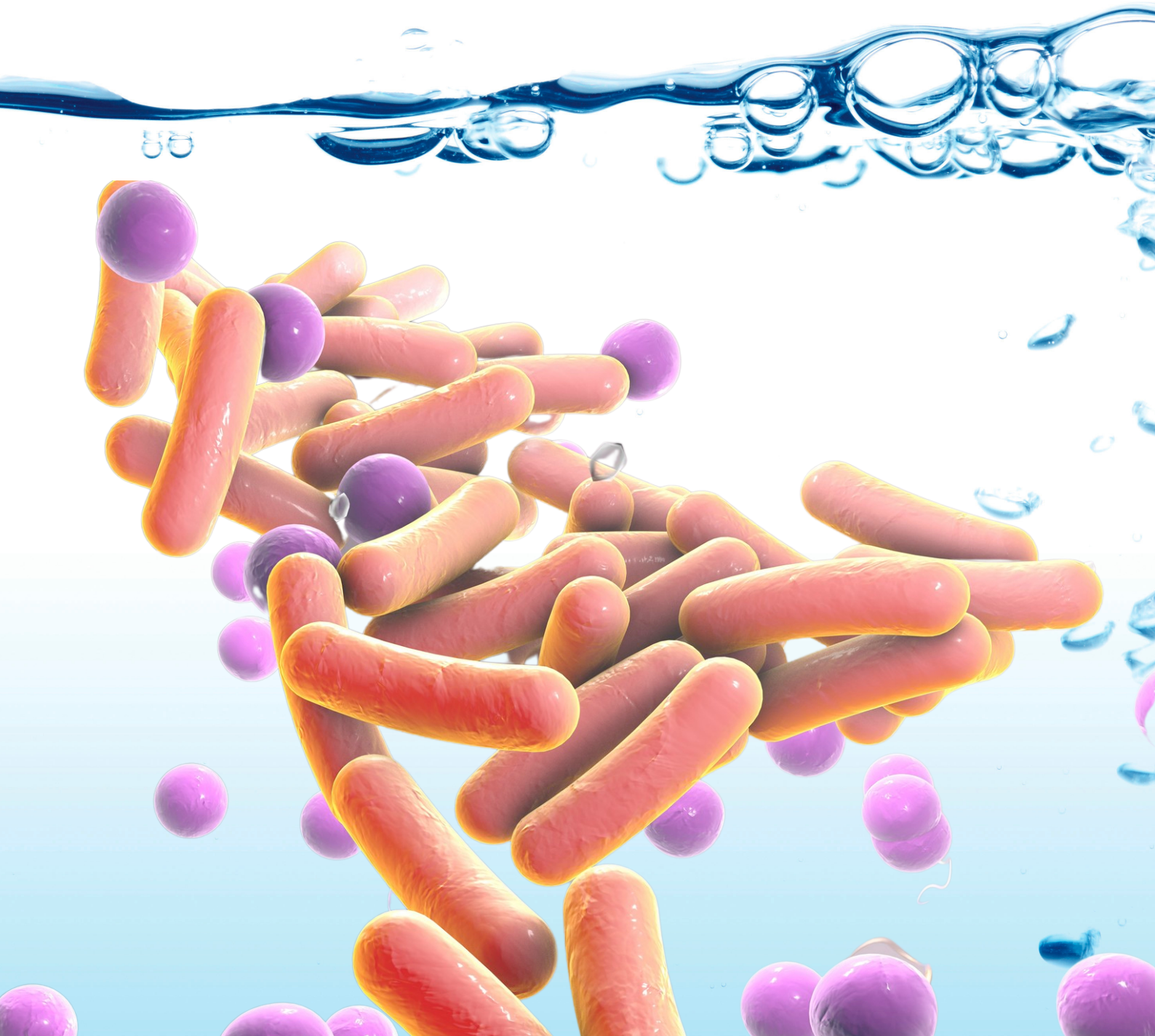
Applicazione del metodo DI-Check Legionella pneumophila per lo screening di campioni di acqua

- DIATHEVA offre un metodo alternativo rispetto al metodo colturale per la rilevazione di *Legionella pneumophila* basato sulla tecnologia di Real Time PCR che permette di ottenere il risultato in meno di 4 ore. Il metodo molecolare DI-Check Legionella pneumophila di DIATHEVA è conforme alla ISO 12869 ed è certificato **AFNOR**

- DI-Check Legionella pneumophila rappresenta un'ottima soluzione per lo screening di tutti i tipi di acque permettendo di escludere in tempi molto brevi i campioni negativi e identificando quelli positivi



Introduzione

La valutazione del potenziale rischio associato alla presenza di *Legionella pneumophila* nei campioni di acqua è attualmente determinata usando il metodo colturale. Il metodo ISO 11731: 2017, "Qualità dell'acqua - Enumerazione della legionella" è un metodo molto complesso che richiede diversi terreni di coltura, tempi lunghi (fino a 10 giorni per un risultato negativo) oltre ad un alto livello di abilità tecnica nell'operazione manuale e nella capacità di riconoscere le colonie caratteristiche della Legionella (a). Tale metodo è inoltre caratterizzato da un errore di misurazione che porta a sottovalutare la conta batterica dal 10 al 60% circa (b).

La legionella può tuttavia essere rilevata con altri metodi tra i quali la Real-Time PCR secondo ISO / TS 12869: 2019. In questo contesto, il metodo DI-Check Legionella pneumophila di Diatheva consente di rilevare e quantificare *L. pneumophila* in tutti i tipi di campioni d'acqua in meno di quattro ore, in conformità con AFNOR XP T90-471 e ISO / TS 12869: 2019. Il metodo si basa su 3 passaggi: filtrazione del campione d'acqua, estrazione del DNA e amplificazione in tempo reale della PCR. Il kit di amplificazione offre una mix di PCR pronta all'uso altamente resistente agli inibitori della PCR e con un sistema hot-start automatico estremamente rigoroso. Questa robusta miscela di PCR contiene un controllo interno per valutare l'efficienza della reazione di amplificazione rivelando la presenza di inibitori nel campione.

Lo scopo di questo lavoro è valutare la possibilità di utilizzare il metodo DI-Check Legionella pneumophila come metodo di screening per rilevare rapidamente la presenza di *L. pneumophila* nei campioni di acqua, permettendo una significativa ottimizzazione delle risorse umane, dei materiali e delle tempistiche di analisi.

Materiali e metodi

I campioni di acqua (n = 101) sottoposti a screening per la contaminazione da *L. pneumophila* sono stati raccolti da un ente ospedaliero locale all'interno dell'edificio dell'ente stesso. I campioni di acqua sanitaria provenivano da diversi siti sottoposti a sanificazione continua con perossido di idrogeno e tutti i campioni sono stati analizzati per la possibile contaminazione da *L. pneumophila* con il metodo di coltura secondo ISO 11731: 2017 e con il metodo DI-Check Legionella pneumophila di Diatheva.

Per l'estrazione del DNA microbico dai batteri Gram negativi presenti nei campioni di acqua è stato utilizzato il DNApure Water Isolation kit (MBK0081, Diatheva). Il DNA purificato è stato amplificato in Real-Time PCR utilizzando il kit DI-Check Legionella pneumophila. L'analisi statistica per confrontare i risultati dell'esame colturale e Real-Time PCR è stata eseguita usando il software GraphPad 5, tramite il test Chi-quadro per esaminare se i risultati dei due metodi (coltura e PCR in tempo reale) fossero indipendenti o meno. Il numero ridotto di campioni è stato compensato tramite la correzione di Yates. Per il metodo molecolare, sono stati calcolati i valori predittivi positivi e negativi (rispettivamente PPV e NPV), corrispondenti al rapporto tra il numero di campioni positivi (o negativi) per entrambi i metodi e il numero di campioni positivi (o negativi) mediante PCR.

Diatheva Srl (C) Copyright (July 23th, 2021) All Rights Reserved

Risultati e Discussione

101 campioni di acqua sanitaria sono stati analizzati mediante coltura e metodo molecolare. 3 campioni (2,9%) sono risultati positivi all'esame colturale e i rimanenti 98 (97,1%) negativi. I 3 campioni positivi in coltura sono stati correttamente rilevati usando il metodo DI-Check Legionella pneumophila. Inoltre, il metodo molecolare ha mostrato 5 campioni positivi che sono risultati negativi al metodo colturale. Come riportato in letteratura, usando il metodo colturale esiste la possibilità di ottenere una sottostima di L.pneumophila, con possibilità di risultati falsi negativi (b).

Il Chi - quadro è stato calcolato considerando 1 grado di libertà e un valore p <0,0001 (α = 0,001). Secondo la distribuzione chi-quadro, per 1 grado di libertà e α = 0,001, il valore critico è 10,83. In questo studio, Il Chi - quadro è stato calcolato pari a 24,109, quindi questi risultati hanno chiaramente mostrato che la cultura e il metodo molecolare sono correlati.

Il PPV e NPV della PCR per i campioni di acqua sanitaria sono risultati rispettivamente del 100% e del 94,8%.

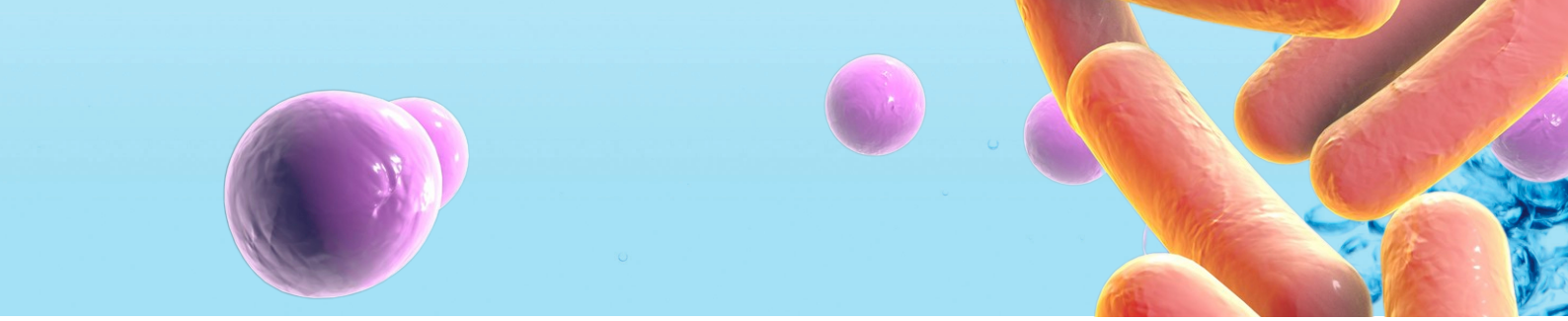
Conclusioni

Il metodo DI-Check Legionella pneumophila di Diatheva ha rilevato un totale di 5 positivi discordanti rispetto ai risultati ottenuti col metodo colturale, su un totale di 101 campioni di acqua testati.
L'elevato valore di NPV (94,8%) ottenuto con il metodo molecolare è indicativo che tale metodo può essere utilizzato per lo screening di campioni negativi, facilitando il controllo tempestivo della *L. pneumophila*, giocando un ruolo chiave per la protezione della salute pubblica.
Il metodo molecolare può essere utilizzato per lo screening dei campioni, potendo in tempi brevi escludere campioni negativi e identificando quelli positivi. In caso di ottenimento di risultati positivi, il microbiologo è incoraggiato ad eseguire la conferma del risultato positivo al colturale secondo le linee guida ISO 12869 con una ricerca più specifica sulla legionella attraverso l'esame colturale. In questo contesto e a conferma di ciò, l'utilizzo della Real Time PCR viene infatti incoraggiato anche dai principali centri di riferimento italiani per Legionella (c).

COLTURALE	Real-time PCR		TOTALI
	Positivi	Negativi	
Positivi	**3**	**0**	3
Negativi	**5**	**93**	98
Totali	**8**	**93**	101

Tabella 1: Tabella delle contingenze per il metodo DI-Check Legionella pneumophila

Diatheva Srl (C) Copyright (July 23th, 2021) All Rights Reserved



Referenze

a Bartie C., Venter S.N. and Nel L.H. (2001) Evaluation of detection methods for Legionella species using seeded water samples. Water SA, 24:523-527.
b Musumeci R., Martinelli M., Signorini L., Calaresu E., Pecovela A., Pastoni F. and Cocuzza C. (2017) Legionella pneumophila in water: performance of culture method detection carried out by Italian laboratories participating to UNICHIM proficiency testing and validation of three molecular methods for quantitative detection. ECCMID, the congress of ESCMID, Vienna 22-25 April 2017.
c Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità Volume 31 - Numero 9 Settembre 2018

Informazioni sull'ordine

CODICE PRODOTTO	DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	FORMATO
MBK0058	**DI-Check Legionella spp. Kit**	**100 tests**
MBK0081	**DI-Check Legionella pneumophila Kit**	**100 tests**
MBK0080	**DNA Pure Water Isolation Kit**	**100 estrazioni**

Visita il nostro sito web **www.diatheva.com** per avere maggiori inforamzioni su **DIATHEVA**

Visita la pagina **https://www.diatheva.com/it/?s=legionella&post_type=product&type_aws=true**

Contattaci all'indirizzo email **info@diatheva.com**

Diatheva is part of the Biotechnology Division of SOL Group Spa, together with Personal Genomics Srl and Cryolab Srl

Diatheva Srl (C) Copyright (July 23th, 2021) All Rights Reserved