

Valutazione dei test Verigene® BC-GP e Verigene® BC-GN per l'identificazione molecolare rapida di agenti eziologici di sepsi e dei relativi determinanti genetici di antibiotico-resistenza a partire da flaconi di emocoltura positivi

¹E. Rossetti, ¹L. Collini, ¹S.D' Arcangelo, ¹C. Bezzi, ¹P. Lanzafame, ¹MB. Simione, ²F. Viganò, ³S. Cofano

¹U.O. Microbiologia e Virologia, APSS, Ospedale S. Chiara, Largo Medaglie d'oro 9, 38123 Trento - ²MOSS, Via all'Erno 5, 28040 Lesa (NO) - ³DiaCare

Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari
Provincia Autonoma di Trento



INTRODUZIONE

La sepsi è una patologia estremamente diffusa e prognosticamente severa: nei pazienti critici, immunocompromessi ed anziani degenti nelle strutture ospedaliere può essere causa principale di morbilità e mortalità. Le linee guida internazionali per il trattamento della sepsi grave e dello shock settico prevedono la somministrazione immediata di un'ampia spettro entro un'ora dalla manifestazione della sintomatologia di sepsi. Una volta isolato ed identificato l'agente eziologico è necessario sostituire la terapia empirica con un trattamento antibiotico mirato ed efficace: la definizione di un regime terapeutico iniziale corretto è infatti associata ad un aumento nella probabilità di sopravvivenza del paziente settico.

La procedura tradizionale di laboratorio correntemente utilizzata per il rilevamento e l'identificazione di patogeni a partire da emocolture positive richiede un'attenta tempistica lunga (anche maggiore di 48 ore) prima di poter definire il profilo dell'agente eziologico di sepsi. Per questo motivo, l'utilizzo di rapidi test diagnostici molecolari che consentano di rilevare ed identificare il patogeno immediatamente dopo la positivizzazione dell'emocoltura faciliterebbe la gestione del paziente settico e promuoverebbe un migliore outcome clinico dello stesso. Tali metodiche consentirebbero infatti l'immediata definizione di una terapia antibiotica mirata, riducendo i costi associati al trattamento prolungato del paziente e contenendo soprattutto il fenomeno dilagante dello sviluppo di ceppi microbici multiresistenti.

In questo studio vengono presentati i risultati ottenuti dall'analisi di emocolture positive per batteri Gram-positivi e batteri Gram-negativi utilizzando il Verigene® Gram-Positive Blood Culture Nucleic Acid Test (BC-GP) e il Verigene® Gram-Negative Blood Culture Nucleic Acid Test (BC-GN) (Nanosphere, Northbrook, IL).

MATERIALI E METODI

Il sistema Verigene® Blood Culture Nucleic Acid Test progettato da Nanosphere è una workstation per la diagnosi molecolare di sepsi che sfrutta la tecnologia brevettata di probes oligonucleotidiche associate a nanoparticelle d'oro per rilevare automaticamente, mediante ibridazione a oligonucleotidi sonda di cattura legati ad un microarray, targets di acido nucleico batterico a partire da emocolture positive. Tale tecnologia si basa su una procedura rapida e sono richiesti 5-10 minuti per l'alimentazione della fase sperimentale), semplice, accessibile e flessibile, che garantisce comunque un'elevata sensibilità, specificità e precisione nella rilevazione ed identificazione a livello di genere, specie e determinanti genetici di antibiotico-resistenza dei principali agenti eziologici di sepsi. Il test Verigene® Gram-Positive Blood Culture identifica 13 targets batterici e 3 determinanti genetici di antibiotico-resistenza, generando i risultati in 2 ore e 50 minuti di processamento; il test Verigene® Gram-Negative Blood Culture identifica 9 targets batterici e 6 determinanti genetici di antibiotico-resistenza, generando i risultati in 1 ora e 50 minuti di processamento. Il sistema Verigene®

riduce quindi drasticamente il tempo richiesto dalla metodica colturale tradizionale per fornire i risultati di identificazione fenotipica dell'agente eziologico di sepsi, che può superare le 48 ore. Sono state analizzate 63 emocolture positive all'esame microscopico (22 gram-negativi e 45 gram-positivi), valutando in parallelo le risposte diagnostiche generate dal metodo tradizionale e dalla tecnologia molecolare rapida in esame. Il sangue è stato raccolto in flaconi BD BACTEC™ successivamente incubati nello strumento BD BACTEC™ FX. Basandosi sui risultati di classificazione preliminare dell'agente eziologico forniti dalla colorazione di Gram, 350 µl di campione non processato prelevato da emocoltura positiva per patogeni Gram-positivi sono stati analizzati con il Verigene® Gram-Positive Blood Culture test, mentre 900 µl di campione non processato prelevato da emocoltura positiva per patogeni Gram-negativi sono stati analizzati con il Verigene® Gram-Negative Blood Culture test.

Il sistema Verigene® è una workstation per la diagnostica molecolare di sepsi semplice, accessibile e flessibile, in grado di garantire un'elevata sensibilità, specificità e precisione nell'identificazione degli agenti eziologici di sepsi a partire da emocolture positive non processate.

Lo strumento Verigene® si compone di un processore, in cui si verificano le reazioni di estrazione ed ibridazione dell'acido nucleico batterico, e di un reader, per la quantificazione e visualizzazione dei risultati. Poiché il campione di partenza è rappresentato da emocolture positive in cui la concentrazione batterica è di norma sufficiente per consentire alla metodica molecolare di identificare correttamente l'agente eziologico, la procedura sperimentale eseguita dallo strumento non prevede

Il test inizia con il caricamento del consumabile contenente supporto per la estrazione e l'analisi di amplificazione nel cassetto del processore, ciascuno dei quali è specifico per la tipologia di patogeno presente nell'emocoltura da analizzare (gram-positivo o gram-negativo). Segue il caricamento del campione clinico non processato nelle quantità di 350 µl di emocoltura positiva per batteri Gram-positivi o di 900 µl di emocoltura positiva per batteri Gram-negativi. Il cassetto del processore viene quindi chiuso per permettere allo strumento di eseguire in maniera automatica le reazioni di estrazione ed ibridazione dell'acido nucleico batterico.

Dopo aver estratto l'acido nucleico batterico dal campione di partenza, il processore trasferisce il target all'interno di una cartuccia monouso. Qui il DNA batterico viene frammentato mediante sonificazione in segmenti di 200-500 bp, per facilitare il successivo step di ibridazione. Nella fase iniziale di ibridazione, il DNA batterico frammentato viene ibridato a oligonucleotidi mediatori sequenza-specifici associati a nanoparticelle d'oro, perfettamente complementari a uno dei 22 target batterici identificati dai due test. Dopo uno step di washing per eliminare le nanoparticelle d'oro e i target che non sono andati incontro a matching perfetto, il complesso nanoparticella-DNA target viene fatto nuovamente ibridare a un set di probes oligonucleotidiche di cattura complementari all'acido nucleico batterico e fissate ad un supporto solido rappresentato da un microarray. Ogni probe di cattura occupa una specifica posizione sull'array, formando una struttura a forma di griglia. Una reazione catalitica terminale deposita argento elementare su ogni nanoparticella d'oro ibridata all'acido nucleico batterico, che amplifica il segnale di luminescenza emesso dalla nanoparticella. Il microarray viene quindi caricato e scansionato nel reader, dove ogni nanoparticella d'oro complessata al DNA target emetterà un segnale luminescente parallelo alla superficie dell'array, consentendo l'identificazione ottica dell'acido nucleico target.

Si tratta di un test che permette di rilevare in modo rapido e accurato la presenza di un agente eziologico di sepsi in un campione clinico non processato. Il test è in grado di rilevare in modo rapido e accurato la presenza di un agente eziologico di sepsi in un campione clinico non processato. Il test è in grado di rilevare in modo rapido e accurato la presenza di un agente eziologico di sepsi in un campione clinico non processato.

Tutti i reagenti necessari per la estrazione e l'analisi di amplificazione sono contenuti nel cassetto di estrazione e di amplificazione. Il cassetto di estrazione e di amplificazione è in grado di rilevare in modo rapido e accurato la presenza di un agente eziologico di sepsi in un campione clinico non processato. Il test è in grado di rilevare in modo rapido e accurato la presenza di un agente eziologico di sepsi in un campione clinico non processato.

Lo strumento segue la maniera convenzionale normale all'analisi di un campione clinico non processato e l'analisi di un campione clinico non processato. Il test è in grado di rilevare in modo rapido e accurato la presenza di un agente eziologico di sepsi in un campione clinico non processato.

Sistema Verigene® Blood Culture Acid Nucleic Test

RISULTATI

In 60 emocolture positive su 63 analizzate, lo strumento Verigene® è stato in grado di individuare l'agente eziologico di sepsi. In particolare, il test molecolare ha identificato 64 patogeni (96%), rispetto ai 67 rilevati dal metodo di identificazione tradizionale.

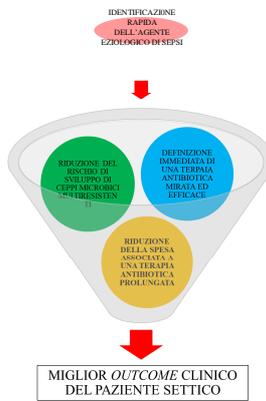
Per quanto riguarda l'identificazione dei determinanti genetici di antibiotico-resistenza, su 14 *Staphylococcus epidermidis* rilevati la metodica molecolare ha correttamente identificato 10 positività per il gene *mecA*, come confermato dagli antibiogrammi preliminari eseguiti in piastra.

In due campioni il sistema Verigene® non ha fornito in output il risultato della rilevazione del gene di resistenza poiché il test molecolare identifica il patogeno con un procedimento a "cascata", che prevede prima l'identificazione del genere, poi della specie ed infine delle eventuali resistenze dell'agente eziologico. Nel caso in cui la specie del patogeno coinvolto non sia disponibile nel pannello del test - come si è verificato in questi due casi - la metodica ne identifica solo il genere e non procede con la successiva rilevazione della specie e del gene di resistenza. Nel corso della sperimentazione non è stata rilevata alcuna positività per i geni di resistenza *vanA*, *vanB*, *OXA*, *KPC*, *IMP*, *VIM*, *CTX-M*, *NDM* e i antibiogrammi diretti eseguiti per tutti i campioni analizzati hanno fornito il medesimo risultato. I risultati delle identificazioni microbiche generati da sistema Verigene® e da metodiche tradizionali sono riportati in **Tabella 1** e **Tabella 2**.

In tre campioni (5%) il sistema Verigene® non è stato in grado di generare risultati di identificazione microbica. Durante l'analisi di due emocolture positive lo strumento ha fornito in output la dicitura "NO CALL-NO GRID": è stato in seguito appurato che la mancata identificazione è stata provocata da problemi tecnici associati alla cartuccia in cui si svolge la reazione di ibridazione tra il target batterico e gli oligonucleotidi sonda. In una terza analisi invece la mancata identificazione dell'agente eziologico responsabile della positività dell'emocoltura è stata causata dall'assenza del target rilevato dal metodo colturale all'interno del pannello disponibile nel sistema Verigene®.

In soli due campioni analizzati la metodica molecolare ha fornito risultati discordanti con quanto rilevato dalle metodiche tradizionali: in un campione il sistema Verigene® ha rilevato una positività per l'agente infettivo *Staphylococcus epidermidis*, mentre la procedura tradizionale di laboratorio ha identificato uno *Staphylococcus xylosum*. In un secondo campione, la metodica molecolare non è stata in grado di identificare uno *Streptococcus anginosus* sp., correntemente rilevato invece dal metodo colturale tradizionale.

In generale, in sole 6 sperimentazioni l'identificazione fenotipica basata sul metodo colturale ha fornito risultati più specifici riguardanti la specie dell'agente eziologico rilevato, in quanto nel pannello del sistema Verigene® non erano incluse le specie batteriche in questione (ad esempio *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus auricularis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus parasanguinis*). In ogni caso, i risultati di identificazione generati dalle due tecniche nel corso di queste sperimentazioni possono dirsi concordi, poiché la metodica molecolare ha comunque identificato il genere corretto dell'agente eziologico.



GENERE	SPECIE	RESISTENZA
Staphylococcus spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	
	<i>Staphylococcus pneumoniae</i>	<i>mecA</i>
	<i>Staphylococcus anginosus</i>	<i>vanA</i>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>vanB</i>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>mecA</i>
Streptococcus spp.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<i>Streptococcus anginosus</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Listeria spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	

SPECIE	RESISTENZA
<i>Acinetobacter</i>	
<i>Enterobacter</i>	
<i>E. Coli</i>	<i>OXA</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>KPC</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>CTX-M</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>NDM</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>VIM</i>
<i>Proteus</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

MICROORGANISMO	Totale VERIGENE	Totale METODICA TRADIZIONALE	MICROORGANISMO	Totale VERIGENE	Totale METODICA TRADIZIONALE
<i>Staphylococcus</i>	6	7	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	<i>Enterococcus faecium</i>	2	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14	13	<i>Listeria</i>	2	2
<i>Streptococcus</i>	4	4	<i>Enterobacter</i>	2	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	<i>E. Coli</i>	15	15
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2
<i>Streptococcus anginosus</i> sp.	4	6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1
			<i>Serratia marcescens</i>	1	1

La seguente tabella mostra i risultati dell'identificazione fenotipica microbica ottenuti dall'analisi di 63 emocolture positive, svolta in parallelo con il sistema Verigene® e con il metodo colturale tradizionale per la diagnosi di sepsi. In alcuni campioni analizzati è stata rilevata un'infezione polimicrobica, determinando il numero maggiore di patogeni identificati rispetto ai campioni effettivamente processati. La workstation Verigene® è stata in grado di rilevare l'agente eziologico di sepsi in 60 campioni su 63 analizzati, mostrando una specificità del 96%. In una sperimentazione, il test Verigene® ha identificato come agente eziologico uno *Staphylococcus epidermidis*, mentre la metodica colturale ha rilevato uno *Staphylococcus xylosum*. In una seconda sperimentazione la metodica molecolare non è stata in grado di confermare l'identificazione colturale di uno *Streptococcus anginosus* sp., rilevando esclusivamente il genere del patogeno infettivo. In sole tre sperimentazioni invece il test Verigene® non ha fornito risultati di identificazione microbica (generato in output la dicitura "NO CALL-NO GRID") a causa di probe.

CAMPIONI	Esito VERIGENE	Esito METODICA TRADIZIONALE	CAMPIONI	Esito VERIGENE	Esito METODICA TRADIZIONALE
1	E. Coli	E. Coli	34	E. Coli	E. Coli
2	NO RESULTS	NESSUNA PRECITTA IDENTIFICAZIONE	35	Staphylococcus	Staphylococcus auricularis mecA
3	Streptococcus anginosus sp.	Streptococcus anginosus	36	Klebsiella oxytoca	Klebsiella oxytoca
4	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis	37	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus xylosum
5	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis mecA	38	Staphylococcus	Staphylococcus hominis
6	Streptococcus pneumoniae	Streptococcus pneumoniae	39	NO CALL - NO GRID	Pseudomonas aeruginosa
7	Enterococcus faecalis	Enterococcus faecalis	40	E. Coli + Streptococcus anginosus sp.	E. Coli + Streptococcus anginosus sp.
8	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis mecA	41	Streptococcus pyogenes	Streptococcus pyogenes
9	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	42	Serratia marcescens	Serratia marcescens
10	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis	43	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis
11	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis	44	Streptococcus agalactiae	Streptococcus agalactiae
12	NO CALL - NO GRID	Streptococcus anginosus	45	Streptococcus + Enterococcus faecalis	Streptococcus oralis + Enterococcus faecalis
13	Enterococcus faecium	Enterococcus faecium	46	E. Coli + Streptococcus anginosus sp.	E. Coli + Streptococcus anginosus
14	Staphylococcus	Staphylococcus haemolyticus	47	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis mecA
15	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis mecA	48	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus
16	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	49	Staphylococcus	Staphylococcus hominis mecA
17	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis mecA	50	Streptococcus	Streptococcus salivarius + Streptococcus parasanguinis
18	E. Coli	E. Coli	51	Streptococcus anginosus sp.	Streptococcus anginosus
19	E. Coli	E. Coli	52	Listeria	Listeria
20	Enterobacter	Enterobacter cloacae	53	Listeria	Listeria
21	E. Coli	E. Coli	54	Enterococcus faecium	Enterococcus faecium
22	E. Coli	E. Coli	55	Streptococcus pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
23	E. Coli	E. Coli	56	Streptococcus	Streptococcus bovis
24	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella pneumoniae	57	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis mecA
25	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus hominis	58	Enterococcus faecalis	Enterococcus faecalis
26	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis mecA	59	Streptococcus	Streptococcus anginosus
27	E. Coli	E. Coli	60	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis mecA
28	E. Coli + Klebsiella oxytoca	E. Coli + Klebsiella oxytoca	61	E. Coli	E. Coli
29	E. Coli	E. Coli	62	E. Coli	E. Coli
30	Staphylococcus	Staphylococcus hominis	63	Enterobacter	Enterobacter cloacae
31	E. Coli	E. Coli			
32	Streptococcus pneumoniae	Streptococcus pneumoniae			
33	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis mecA			

La workstation Verigene® è stata in grado di rilevare l'agente eziologico di sepsi in 60 campioni su 63 analizzati, mostrando una specificità del 96%. In una sperimentazione, il test Verigene® ha identificato come agente eziologico uno *Staphylococcus epidermidis*, mentre la metodica colturale ha rilevato uno *Staphylococcus xylosum*. In una seconda sperimentazione la metodica molecolare non è stata in grado di confermare l'identificazione colturale di uno *Streptococcus anginosus* sp., rilevando esclusivamente il genere del patogeno infettivo. In sole tre sperimentazioni invece il test Verigene® non ha fornito risultati di identificazione microbica (generato in output la dicitura "NO CALL-NO GRID") a causa di probe.

La workstation Verigene® è stata in grado di rilevare l'agente eziologico di sepsi in 60 campioni su 63 analizzati, mostrando una specificità del 96%. In una sperimentazione, il test Verigene® ha identificato come agente eziologico uno *Staphylococcus epidermidis*, mentre la metodica colturale ha rilevato uno *Staphylococcus xylosum*. In una seconda sperimentazione la metodica molecolare non è stata in grado di confermare l'identificazione colturale di uno *Streptococcus anginosus* sp., rilevando esclusivamente il genere del patogeno infettivo. In sole tre sperimentazioni invece il test Verigene® non ha fornito risultati di identificazione microbica (generato in output la dicitura "NO CALL-NO GRID") a causa di probe.

In sole tre sperimentazioni invece il test Verigene® non ha fornito risultati di identificazione microbica (generato in output la dicitura "NO CALL-NO GRID") a causa di probe.