

Diagnosi rapida di sepsi: *Beacon Based FISH* come nuovo approccio nell'identificazione eziologica rapida

¹S. D'Arcangelo, ¹L. Collini, ¹E. Rossetti, ¹C. Bezzi, ²I. Bertuzzi, ¹P. Lanzafame

1. U.O. Microbiologia e Virologia, APSS, Ospedale S. Chiara, Largo Medaglie d'oro 9, 38123 Trento

2. A.D.A. Diagnostics

INTRODUZIONE

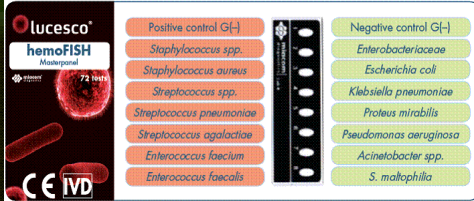
Negli ultimi anni la sfida nella diagnosi di sepsi è stata quella di mettere a punto nuove tecniche sempre più rapide e sensibili, cosicché la terapia antibiotica potesse essere aggiustata tempestivamente.

In questo senso la beacon-based FISH è una tecnica che si basa sull'ibridazione di sonde specifiche per un particolare patogeno, atta all'identificazione dei più comuni batteri che causano setticemia, direttamente da emocoltura positiva.

Questo studio valuta le performance della *Lucesco® hemoFISH Masterpanel*, che identifica sia batteri Gram + che batteri Gram -.

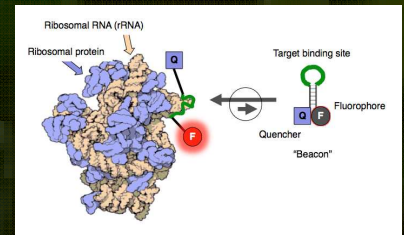
MATERIALI E METODI

61 emocolture positive (in flaconi Becton-Dickinson BACTEC®) sono state analizzate con il metodo *Lucesco® hemoFISH Masterpanel* *Miacom*: tale pannello rileva batteri sia Gram + che Gram come nello



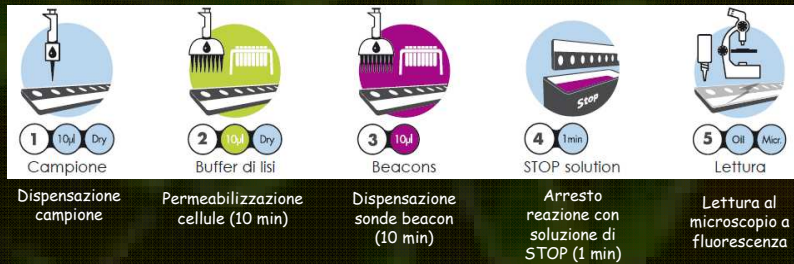
I patogeni elencati nella colonna di sinistra sono visibili tramite fluorescenza nel range di lunghezza in campo rosso (rodamina); a destra abbiamo i patogeni rilevabili con fluorescenza nel range di lunghezza in campo verde (fluoresceina).

Il metodo è caratterizzato dall'uso di una speciale sonda "a forcina" BEACON che va ad ibridarsi con la regione specie-specifica 16S dell'RNA ribosomiale batterico. La sonda BEACON si apre ed emette fluorescenza solo se incontra la sua sequenza target: non si ha quindi presenza di background.



Per l'esecuzione del test : 25 ul di campione vengono diluiti 1:20 con la soluzione isotonica "Clinical sample buffer"; e quindi si procede secondo lo schema in figura:

Il tempo totale di esecuzione è di circa 30 minuti.



RISULTATI

I 61 test effettuati con bb-FISH hanno mostrato i seguenti risultati:

G+	
<i>Staphylococcus spp.</i>	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	5
<i>Streptococcus spp.</i>	8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1
G-	
<i>Enterobacteriaceae</i>	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>E. Coli</i>	12
<i>K. pneumoniae</i>	2
<i>Blastomyceti</i>	3
Nessun patogeno rilevato	2

Tali risultati mostrano una concordanza del 99% con la diagnostica convenzionale dell'identificazione su piastra.

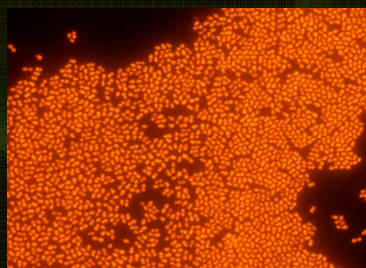
In 2 casi il Masterpanel non ha rilevato alcun risultato: in uno perché il patogeno responsabile della sepsi era una *Listeria*, non presente nel pannello (controllo positivo OK).

Nell'altro caso anche con le metodiche biochimiche tradizionali non è stato possibile identificare il microorganismo classificato come *various non fermentans bacilli*, microorganismo presumibilmente non presente nel master-panel.

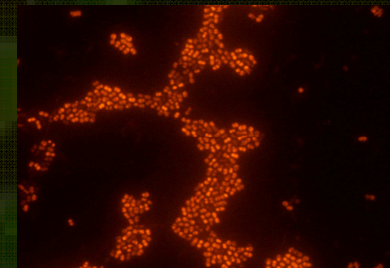
CONCLUSIONI

La tecnica bb-FISH si è dimostrata estremamente vantaggiosa per l'identificazione microbiologica rapida in corso di sepsi:

- il Masterpanel permette di rilevare contemporaneamente la presenza di 14 patogeni;
- il tempo di esecuzione di soli 30 minuti è un valore aggiunto che consente di ricorrere rapidamente ad una terapia mirata;
- dal punto di vista pratico l'uso della sonda BEACON, che si fissa ed emette segnale solo in presenza della sequenza target, permette una velocizzazione del lavoro in quanto non occorrono lavaggi ripetuti per eliminare sonda in eccesso;
- la sonda si lega all'acido nucleico target all'interno della cellula batterica intera: la cellula diventa quindi visibile al microscopio, rendendo possibile una valutazione quantitativa oltre che qualitativa.



Streptococcus agalactiae



Enterococcus faecalis