

FilmArray® multiplex PCR: una nuova frontiera nella diagnosi eziologica di sepsi

¹E. Rossetti, ¹L. Collini, ¹S.D'Arcangelo, ¹C. Bezzi, ¹L. Pederzoli, ²S. Madama, ²M. Palumbo, ²E. Bergese, ¹P. Lanzafame

¹U.O. Microbiologia e Virologia, APSS, Ospedale S. Chiara, Largo Medaglie d'oro 9, 38123 Trento - ²D.I.D., BioFire Diagnostics, Inc., Salt Lake City, Utah 84108 USA

Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari
Provincia Autonoma di Trento



INTRODUZIONE

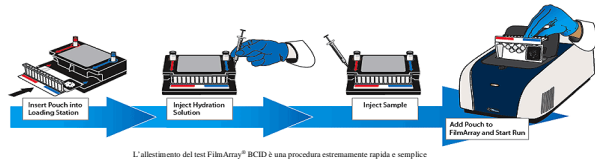
La sepsi rappresenta una problematica clinica di assoluta rilevanza e costituisce una delle più comuni cause di decesso nelle Unità di Rianimazione (ICU), provocando la morte di una proporzione compresa tra il 30 e il 50% dei pazienti affetti da una forma acuta e riducendo sostanzialmente la qualità di vita dei pazienti che sopravvivono. La procedura tradizionale di laboratorio correntemente utilizzata per il rilevamento e l'identificazione degli agenti eziologici di sepsi a partire da emocolture positive ha come limitazione principale la lunga tempistica necessaria al suo completamento (24-48 ore). Questo può provocare un notevole ritardo nella risposta clinica necessaria per definire un'ottimale terapia antibiotica mirata da somministrare al paziente settico, determinando un rapido incremento nella morbilità e mortalità associate a tale patologia. Poiché nella diagnostica della sepsi la variabile "tempo" è un valore di assoluta rilevanza in termini di outcome clinico, è possibile ricorrere a rapidi test diagnostici molecolari che consentono di rilevare e identificare il patogeno immediatamente dopo la positivizzazione dell'emocoltura, facilitando il trattamento del paziente settico mediante l'immediata progettazione di un regime terapeutico mirato ed ottimale.

MATERIALI E METODI

Il FilmArray® Blood Culture ID (BCID) progettato da BioFire Diagnostics Inc. è una piattaforma diagnostica integrata che utilizza un protocollo di *nested multiplex PCR (mPCR)* per identificare 20 target batterici (a livello di genere e/o specie), 5 lieviti e 4 determinanti genetici di antibiotico-resistenza in un campione clinico non processato. È una metodologia estremamente sensibile in cui uno specifico target è amplificato mediante un processo a due fasi, utilizzando per il primo stage di amplificazione (circa 20 cicli) una coppia di primers "esterni" ad ampio range complementari a domini proteici conservati tra tutti i batteri di interesse e, per il secondo stage, primers specie-specifici che fanno annealing in una regione interna all'amplicone prodotto dalla prima PCR e amplificano quindi il target specifico di interesse. Il test molecolare è in grado di fornire i risultati un'ora dopo l'avvenuta positivizzazione dell'emocoltura nell'incubatore, a differenza delle procedure tradizionali di laboratorio per l'analisi di emocolture positive, che possono fornire una risposta clinica anche dopo più di 48 ore dalla positivizzazione del flacone.

Sono state analizzate 42 emocolture segnalate positive dallo strumento BD BACTEC™ FX, valutando in parallelo il metodo tradizionale utilizzando tipizzazione biochimica con pannelli Microscan WA Siemens e dalla tecnologia molecolare rapida in esame.

300 µl di emocoltura sono stati prelevati da flaconi BD BACTEC™ (per patogeni aerobi, anaerobi e flaconi pediatrici), mescolati ad un *Simple Lysis Buffer* e successivamente iniettati nello strumento FilmArray® che ha eseguito in maniera automatica le reazioni di estrazione e purificazione dell'acido nucleico target e la sua amplificazione mediante *nested PCR*.



L'allineamento del test FilmArray® BCID è una procedura estremamente rapida e semplice.

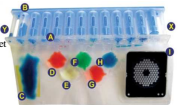


Le Tabelle 1 e 2 mostrano i risultati ottenuti dall'analisi di 42 emocolture positive con piattaforma FilmArray® e procedura tradizionale di laboratorio. Alcuni campioni processati sono risultati positivi per più di un patogeno (infezione polimicrobica), determinando l'identificazione di un numero maggiore di microrganismi rispetto al numero di campioni effettivamente analizzati. Lo strumento FilmArray® ha identificato l'agente eziologico di sepsi nella quasi totalità delle sperimentazioni (40 campioni su 42), mostrando una sensibilità di identificazione del 94% (sono stati rilevati 44 patogeni come i 47 identificati dalla procedura tradizionale). Nell'analisi di due emocolture, che la metodica culturale ha definito positive una per *Staphylococcus aureus* e una per un'infezione polimicrobica (*Streptococcus parva* e *Streptococcus salivarius*), il test molecolare non è stato in grado di identificare correttamente i patogeni: nel caso dell'emocoltura positiva per *Staphylococcus aureus*, lo strumento FilmArray® ha identificato solo la resistenza ad esso associata (*mecA*); nel caso dell'emocoltura positiva per l'infezione polimicrobica il test molecolare ha rilevato esclusivamente il genere dei microrganismi coinvolti (*Streptococcus*). In solo 2 sperimentazioni problemi tecnici non hanno permesso alla metodica molecolare di generare alcun risultato. Valutazioni comparative hanno dimostrato come il gruppo di patogeni definito dallo strumento FilmArray® *Staphylococcus 1-2* faccia riferimento a *Staphylococcus coagulans* negativi.

La piattaforma integrata FilmArray® è un sistema chiuso, estremamente rapido e semplice che svolge in maniera automatica, all'interno di un pouch monouso, compatto le reazioni di estrazione, purificazione ed identificazione dell'acido nucleico batterico presente in un campione clinico/clinico non processato.

Procedura sperimentale del test FilmArray®

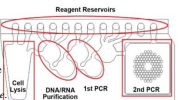
Il test inizia con l'iniezione di circa 1 ml di *Hydration Solution* nel pouch, per reidrattare i reagenti liofili in esso contenuto. Segue il prelievo con una *pasteur* sterile di circa 300 µl di emocoltura che vengono miscelati ad un *Simple Lysis Buffer*. 300 µl della soluzione così formata vengono iniettati nel pouch, il quale viene caricato nello strumento FilmArray®. Lo sperimentatore inserisce l'ID del pouch, leggendo il *barcode*, digita i dati del paziente ed avvia la corsa. Lo strumento FilmArray® svolge in maniera automatica l'analisi dei risultati, che vengono forniti in 1 ora.



In uno specifico serbatoio del pouch (A) sono concentrati in forma liofila tutti i reagenti necessari per la preparazione del campione e l'amplificazione ed identificazione del target batterico. La pellicola inferiore del FilmArray® è costituita da "bolle" e canali che rappresentano specifiche stazioni in cui si verifica l'intero processo del campione, in particolare:

- Lisi cellulare (C) mediante biglie di ceramica;
- Purificazione dell'acido nucleico mediante biglie magnetiche (D e E);
- Primo stage di *multiplex PCR* (F e G);
- *Array* costituito da 102 wells in cui si verifica un secondo stage di *nested PCR* (I).

Durante la prima *multiplex PCR* si verificano simultaneamente molteplici reazioni di amplificazione in cui intervengono dozzine di primers "esterni". Gli ampliconi della prima PCR vengono diluiti (100x) e, all'interno di ogni well dell'*array*, inizia una seconda fase di amplificazione (denominata *inner nested PCR*) realizzata da set di primers "interni" che sono disegnati per amplificare specifiche sequenze target contenute Negli ampliconi prodotti nella prima fase di amplificazione. Un *Dye* fluorescente che lega *dSNA* permette di rilevare i prodotti della seconda reazione di PCR in *real-time*.



- A. Camera con i reagenti liofilizzati
- B. Canali che trasferiscono i reagenti al blister
- C. Camera di lisi del campione contenente biglie di ceramica
- D. Camera di washing
- E. Camera contenente biglie magnetiche
- F. Stazione di diluizione
- G. Blister di *multiplex outer PCR*
- H. Blister di diluizione
- I. Array dove si verifica *inner nested PCR*

CAMPIONI	Esito FILMARRAY	Esito METODICA TRADIZIONALE	CAMPIONI	Esito FILMARRAY	Esito METODICA TRADIZIONALE
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>
2	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus hominis mecA</i>	24	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	25	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus hominis mecA</i>
4	<i>E. Coli + Klebsiella oxytoca</i>	<i>E. Coli + Klebsiella oxytoca</i>	26		<i>Streptococcus salivarius + Streptococcus parva</i>
5	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	27		<i>Streptococcus anginosus</i>
6	NO RESULTS	NESSUNA PRECISA IDENTIFICAZIONE	28		<i>Listeria monocytogenes</i>
7	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	29		<i>Listeria monocytogenes</i>
8	NO RESULTS	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	30	<i>Enterococcus + Candida glabrata</i>	<i>Enterococcus faecium + Candida glabrata</i>
9	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>	31		<i>Streptococcus pneumoniae</i>
10	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>	32		<i>Streptococcus pneumoniae</i>
11	<i>mecA</i>	<i>Staphylococcus aureus mecA</i>	33		<i>Streptococcus pneumoniae</i>
12	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	34	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>
13	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus silybius mecA</i>	35	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
14	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus hominis mecA</i>	36	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>
16	<i>E. Coli + Enterococcus</i>	<i>E. Coli + Enterococcus faecalis</i>	38	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
17	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	39	<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>
18	<i>Serratia</i>	<i>Serratia</i>	40	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
19	<i>Staphylococcus 1-2</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	41	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
20	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	42	<i>Staphylococcus 1-2 mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>
21	<i>Streptococcus + Enterococcus</i>	<i>Streptococcus omnia + Enterococcus faecalis</i>			
22	<i>E. Coli + Streptococcus</i>	<i>E. Coli + Streptococcus anginosus</i>			

Tabella 1

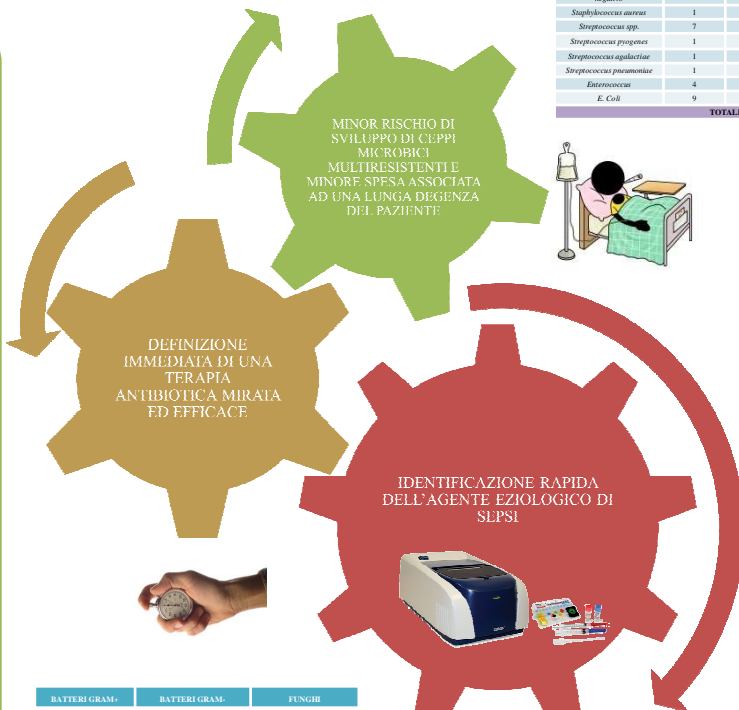
MICROORGANISMO	Totale FILMARRAY	Totale METODICA TRADIZIONALE	MICROORGANISMO	Totale FILMARRAY	Totale METODICA TRADIZIONALE
<i>Staphylococcus coagulans</i> negativo	10	11	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1
<i>Streptococcus spp.</i>	7	8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	<i>Serratia</i>	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	2	<i>Listeria monocytogenes</i>	2	2
<i>Enterococcus</i>	4	4	<i>Candida glabrata</i>	1	1
<i>E. Coli</i>	9	9	<i>Candida albicans</i>	1	1
TOTALE				44	47

Tabella 2

RISULTATI

Lo strumento FilmArray® è stato in grado di fornire risultati di identificazione microbica in 40 emocolture positive su 42 analizzate. In particolare, il test molecolare ha identificato 44 agenti eziologici di sepsi (94%), mentre le metodiche tradizionali (coltura in piastra, identificazione biochimica, tipizzazione sierologica) non hanno rilevato 47. I risultati delle identificazioni microbiche generati da FilmArray® e metodiche tradizionali sono riportati in Tabella 1 e Tabella 2. In soli due campioni analizzati il test molecolare non è stato in grado di rilevare alcun target batterico: in un campione la mancata identificazione è stata provocata dall'assenza del target rilevato dal metodo culturale all'interno del pannello disponibile nello strumento FilmArray®, nell'altro, il sistema ha presentato una problematica tecnica dovuta a mancata reidratazione dei reagenti liofili, probabilmente per un difetto di aspirazione o un difetto legato al pouch.

Nell'analisi di due emocolture, che la metodica tradizionale, identificazione biochimica e antibiogramma, hanno definito positive una per *Staphylococcus aureus* e una per un'infezione polimicrobica (*Streptococcus parva* e *Streptococcus salivarius*), lo strumento FilmArray® nel caso dell'emocoltura positiva per *Staphylococcus aureus* ha identificato solo la resistenza ad esso associata (*mecA*); nel caso dell'emocoltura positiva per l'infezione polimicrobica il test molecolare ha rilevato esclusivamente il genere dei microrganismi coinvolti (*Streptococcus*). È stata sempre rilevata una perfetta concordanza tra i risultati ottenuti con il test molecolare e quelli generati dal metodo tradizionale per quanto riguarda le resistenze associate all'agente eziologico. Sono stati rilevati 9 positività per il gene di resistenza *mecA*, tutte associate a stafilococchi coagulanti negativi, come confermato dagli antibiogrammi diretti allestiti in piastra (100%). Non è stata invece rilevata alcuna positività per i geni *vanA/vanB* e *KPC* e gli antibiotici preliminari eseguiti per tutti i campioni analizzati hanno fornito il medesimo risultato.



BATTERI GRAM-	BATTERI GRAM+	FUNGHI
<i>Staphylococcus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Serratia</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Proteus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Actinobacter humanus</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	
<i>Enterococcus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	RESISTENZE ANTIBIOTICHE
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>mecA</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>vanA/vanB</i>
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>KPC</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	

Pannello dei target batterici identificati da BCID FilmArray®

GENI HOUSEKEEPING	FATTORI DI VIRULENZA
RNA Polimerasi B (<i>rpoD</i>)	Enterocina <i>pingue</i> streptococcica (<i>speD</i>)
Girasi B (<i>gyrB</i>)	Autolisina (<i>lysA</i>)
Proteina A della membrana esterna (<i>ompA</i>)	Capsule <i>protein</i> <i>exporA</i> (<i>ctrA</i>)
RNA Polimerasi B (<i>levi</i>) RPB1	Neuraminidasi H (<i>neurH</i>)
Gene acetico (<i>levi</i>)	Nucleasi (<i>nac</i>)
	Capsule <i>gene</i> (<i>hlyA</i>)
	Surface immunogenic <i>protein</i> (<i>slp</i>)

Target genici rilevati da BCID FilmArray®

CONCLUSIONI

La piattaforma diagnostica FilmArray® rappresenta uno strumento estremamente innovativo ed efficace per l'identificazione rapida degli agenti eziologici di sepsi in campioni clinici non processati. La metodica ha dimostrato una notevole sensibilità e specificità nell'identificare correttamente i target batterici e le resistenze ad essi associate disponibili nel pannello BCID dopo un'ora di processo: 44 patogeni su 47 sono stati correttamente rilevati, attestando una sensibilità e un grado di concordanza del 94%. Su 42 emocolture analizzate il test molecolare ha correttamente rilevato la presenza di patogeni in 40 campioni (95%), poiché due sperimentazioni non hanno fornito risultati di identificazione microbica.

Da questi risultati è stato possibile concludere come l'utilizzo della piattaforma FilmArray® nella pratica clinica permetterebbe di migliorare notevolmente la gestione dei pazienti settici degenti presso le unità ospedaliere, riducendo in maniera drastica (24-72 ore o più) i tempi richiesti dalla diagnostica tradizionale di laboratorio per l'identificazione dell'agente eziologico e la conseguente progettazione di una terapia antibiotica mirata ed efficace. L'utilizzo di tale metodica molecolare rapida non potrebbe prescindere dall'esecuzione parallela dei test diagnostici tradizionali. Tuttavia, esso consentirebbe il superamento del problema dilagante in ambito clinico dello sviluppo di ceppi microbici multiresistenti provocato dal crescente impiego di terapie antibiotiche empiriche ad ampio spettro come immediata strategia con cui trattare il paziente settico in attesa dell'identificazione dell'agente eziologico e della definizione di una terapia mirata.