

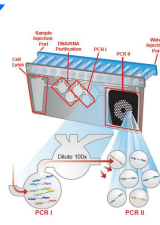
Confronto di tre metodi molecolari nella diagnosi rapida di sepsi

¹L.Collini, ¹L.Zeni ¹S.D'Arcangelo, ¹E.Rossetti ¹, Bezi, ¹L.Tomasi, ¹P.Lanzafame
¹U.O. Microbiologia e Virologia, APSS, Ospedale S.Chiera, Largo Medaglie d'oro 9, 38123 Trento

La sepsi rappresenta oggi la causa più frequente di mortalità nel paziente critico. Quanto più la diagnosi eziologica è tempestiva tanto più è possibile instaurare una terapia precoce e specifica. L'emocoltura, pur rappresentando il metodo di laboratorio di riferimento, mostra almeno due limitazioni: non garantisce tempi rapidi di risposta fondamentali per i pazienti critici e può fornire risultati falsi-negativi. In un laboratorio di microbiologia è opportuno pertanto disporre di metodi diagnostici che consentano di offrire una risposta nel minor tempo possibile ad una specifica richiesta clinica. Le nuove indagini molecolari sembrano rappresentare strategie diagnostiche molto promettenti. Negli ultimi sei mesi presso l'U.O di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale S.Chiera di Trento abbiamo sperimentato tre nuovi metodi molecolari che potessero garantire un elevato grado di sensibilità e specificità, rapidità di rilevazione di un vasto spettro di microrganismi, un'elevata sensibilità analitica anche in corso di terapia antibiotica e in due dei tre metodi un genotipo di resistenza.



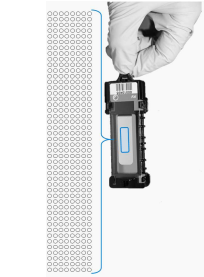
Sono state analizzate 40 emocolture segnalate positive al metodo tradizionale BD Bactec FX con tre metodiche molecolari. La sperimentazione è stata impostata nell'ottica di un confronto volto a valutare: il grado di concordanza tra i risultati di identificazione del microrganismo (in termini di genere, specie e determinanti genetici di antibiotico-resistenza in due delle tre metodiche molecolari) forniti da ciascuno dei test molecolari e dalla metodica tradizionale (identificazione biochimica/sierologica e antibiogramma); la sensibilità nel rilevare correttamente il patogeno responsabile; i vantaggi che la rapidità nell'identificazione dell'agente eziologico di sepsi consentita dalle tre tecniche rapide apporterebbe alla gestione clinica del paziente settico.



Il *FilmArray® Blood Culture ID (BCID)* progettato da BioFire Diagnostics Inc. è una piattaforma diagnostica integrata che utilizza un protocollo di *nested multiplex PCR (nmPCR)* per identificare in *real-time* 20 *targets* batterici (a livello di genere e/o specie), 5 lieviti e 4 determinanti genetici di antibiotico-resistenza in un campione clinico non processato, fornendo i risultati di identificazione in circa un'ora di processamento.

Il sistema *beacon based FISH (bb-FISH)* brevettato da Miacom® Diagnostics impiega innovative sonde molecolari "*Beacons*" marcate con un fluorocromo all'estremità 5' (fluorescenza verde o rossa a seconda della tipologia di patogeno che deve essere identificato) e con una molecola *Quencher* all'estremità 3'. Le sonde molecolari "*Beacons*" sono in grado di identificare regioni conservate specie-specifiche di 16S RNA ribosomiale (rRNA), target estremamente conservato nelle varie specie batteriche. Un pannello "*Masterpanel*" identifica dopo circa 30 minuti 14 patogeni (Gram-negativi e Gram-positivi) tra i più frequenti e clinicamente rilevanti agenti eziologici di sepsi.

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. Sono stati utilizzati i due test disponibili per la sepsi: il test *Verigene® Gram-Positive Blood Culture*, che identifica 13 *targets* batterici e 3 determinanti genetici di antibiotico-resistenza in 2 ore e 50 minuti ed il test *Verigene® Gram-Negative Blood Culture*, che identifica 9 *targets* batterici e 6 determinanti genetici di antibiotico-resistenza in 1 ora e 50 minuti.



L'analisi dei quaranta campioni clinici svolta in parallelo con le tre tecniche molecolari ha fornito nella gran parte dei casi risultati concordanti, riguardanti sia le identificazioni fenotipiche microbiche fornite in parallelo dalle metodiche rapide, sia quelle ottenute dalle procedure diagnostiche tradizionali di laboratorio (coltura in piastra, identificazione biochimica, tipizzazione sierologica). I risultati delle identificazioni generati dalle tre tecniche molecolari sono riassunti in **Tabella 1**. Le discordanze osservate nei risultati forniti in parallelo dalle tre tecniche molecolari sono dovute da differenze nel numero e nella tipologia dei patogeni rilevabili dai vari pannelli di identificazione microbica disponibili nelle tre analisi molecolari. In particolare, alcuni pannelli dispongono di un numero maggiore di patogeni potenzialmente coinvolti nell'infezione, altri presentano un numero maggiore di geni di resistenza potenzialmente espressi dall'agente microbico.

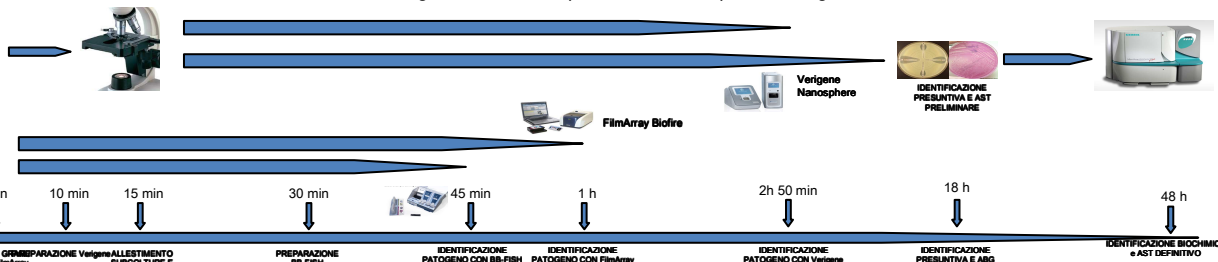
Tabella 1

PATOGENO	N° patogeni identificati da FilmArray	N° patogeni identificati da Verigene®	N° patogeni identificati da bbFISH
<i>Staphylococcus</i>	Non presente nel pannello	4	10
<i>Staphylococcus coagulans</i> negativo	10	Non presente nel pannello	Non presente nel pannello
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Non presente nel pannello	6	Non presente nel pannello
TOTALE	11	11	11
<i>Streptococcus</i>	8	4	9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	1	Non presente nel pannello
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	2	2
<i>Streptococcus anginosus</i> gr.	Non presente nel pannello	4	Non presente nel pannello
TOTALE	11	12	12
<i>Enterococcus</i>	3	Non presente nel pannello	Non presente nel pannello
<i>Enterococcus faecalis</i>	Non presente nel pannello	2	2
<i>Enterococcus faecium</i>	Non presente nel pannello	1	1
TOTALE	3	3	3
<i>Listeria</i>	2	2	Non presente nel pannello
<i>Enterobacteriaceae</i>	Non presente nel pannello	Non presente nel pannello	2
<i>Enterobacter</i>	1	1	Non presente nel pannello
<i>E. Coli</i>	9	9	9
TOTALE	9	9	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	NO CALL, NO GRID	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2	Non presente nel pannello
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	1
<i>Serratia marcescens</i>	1	1	Non presente nel pannello
<i>Candida albicans</i>	1	Non presente nel pannello	1
<i>Candida glabrata</i>	1	Non presente nel pannello	1
TOTALE	44	42	41

COLORAZIONE DI GRAM



REMOZIONE EMOCOLTURA POSITIVA DALL'INCUBATORE



Tutti i tre metodi molecolari si sono dimostrati di facile esecuzione, robusti, specifici, ma soprattutto rapidi. I risultati di identificazione ottenuti hanno dimostrato come l'utilizzo in ambito clinico di strumentazioni diagnostiche rapide, pur non potendo prescindere dall'esecuzione parallela delle metodiche tradizionali (identificazione biochimica/sierologica e antibiogramma), apporterebbe un notevole vantaggio nella gestione dei pazienti settici. La tempistica richiesta dalle tecniche molecolari per processare il campione clinico immediatamente dopo la sua positivizzazione e fornire in *output* risultati di identificazione dell'agente eziologico è di gran lunga inferiore rispetto al tempo impiegato dalla diagnosi tradizionale di laboratorio. Il test molecolare che richiede un tempo maggiore è quello eseguito dallo strumento *Verigene®* (approssimativamente a 2 ore e 50 minuti), tempo che risulta notevolmente inferiore al tempo richiesto dalla metodica tradizionale (in alcuni casi anche maggiore alle 48 ore dalla positivizzazione dell'emocoltura). La possibilità di ottenere una risposta specifica ed esaustiva in un tempo ridotto risulta di notevole ausilio per il clinico nell'impostare una terapia antibiotica mirata ed ottimale il prima possibile. La possibilità di ridurre un regime terapeutico empirico ad ampio-spettro non solo può portare al contenimento ed alla riduzione di ceppi microbici multiresistenti, ma anche ad una drastica diminuzione della spesa sanitaria associata a trattamenti terapeutici inappropriati con conseguenti tempi di degenza prolungati nel tempo.