

# "THE NEED FOR SPEED": ESPERIENZA IN BIOLOGIA MOLECOLARE UTILIZZANDO IL SISTEMA GENEXPERT

M.C. Screm., A. Arzese, M. Di Santolo, L. Clemente, C. Scarpato  
SOC di Microbiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Udine

## INTRODUZIONE

Diagnosi microbiologica ed urgenza sono termini estremamente difficili da coniugare. Una risposta microbiologica completa con tipizzazione specifica e test di sensibilità richiede normalmente almeno 48 ore dal ricevimento del campione. Tuttavia, alcune situazioni cliniche necessitano di risposte urgenti, disponibili entro poche ore, per una corretta gestione del paziente e per problemi di salute pubblica. Queste possono essere riassunte in:  
pazienti critici con complicità infettiva con gravi conseguenze sull'outcome clinico (immunocompromissione innata, acquisita o iatrogena, pazienti in ICU)  
infezioni altamente diffusibili che necessitano di isolamento e screening dei contatti  
trasmissione di infezioni materno-fetali nel peri-partum.  
infezioni acute gravi (meningo-encefalite)

Le tecniche di Biologia Molecolare hanno sensibilmente ridotti i tempi, pur richiedendo circa una giornata lavorativa per estrazione degli acidi nucleici, amplificazione del target, e rivelazione dell'amplificato, nonché spazi dedicati e personale con formazione e competenze specifiche.

La recente introduzione del sistema GeneXpert (Cepheid) sembra costituire una significativa innovazione per semplicità e velocità di esecuzione. In uno studio preliminare abbiamo valutato l'utilizzo di questo sistema nella diagnostica microbiologica "urgente", nonché nelle sale-parto come punto di analisi decentrato.

## MATERIALI E METODI

Tettatura una valutazione comparativa dei risultati ottenuti da 51 campioni clinici mediante metodiche di diagnostica microbiologica routinaria e/o real time PCR convenzionale (Artus, Quiagen) verso GeneXpert PCR (Cepheid) nell'identificazione dei seguenti microrganismi:

- Mycobacterium tuberculosis* complex e sensibilità alla Rifampicina (Tabella I)
- Clamidia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* (Tabella II)
- Staphylococcus aureus* meticillina resistente (Tabella III)
- Streptococco beta-emolitico gruppo B (GBS) (Tabella IV)

CASISTICA n. 11 M.C. P. 0.7	RISULTATI		
	BIOME MICROSCOPICO	TEST DI RIFAMPICINA Etambutolo	Xpert MTB/RIF
Età da 1.50 anni Sex: maschio malattia: TB			
Contaminazione n. 1 Campione non replicato n. 6			
Patologia tubercolare n. 6 Determinazione da BCG n. 2	Positivo n. 6 Negativo n. 1 Positivo n. 1	M. tuberculosis n. 6 M. tuberculosis MDR n. 1	MIP positivo/clinico/medico n. 5 MIP positivo/clinico/resistente n. 1
Malattia n. 1	Positivo n. 1 Negativo n. 1 Positivo n. 1	M. BCG n. 2 M. abscessus n. 2 M. fortuitum n. 1	MIP positivo/clinico/medico n. 2 MIP negativo n. 1 Contaminazione n. 1

Tab. I: casistica e risultati per il test Xpert MTB/RIF nella diagnostica della tubercolosi e della tubercolosi multi farmaco-resistente MDR o XDR

CASISTICA n. 18 F	RISULTATI				
	Campione Sex di riferimento Biotipico (Quipa)	Campione XpertCTNG	Campione Sex di riferimento Esame colturale	Campione XpertCTNG	Campione XpertCTNG
Età da 4.50 anni Sex: maschio malattia: TB					
Età da 15 anni Sex: maschio Malattia: sepsi peritoneale n. 17 P. 0.1 Malattia: meningite n. 1	Positivo n. 7 Negativo n. 15	Positivo n. 7 Negativo n. 15 Contaminazione n. 1	Positivo n. 11 Negativo n. 15 Contaminazione n. 1	Positivo n. 7 Negativo n. 15 Contaminazione n. 1	Positivo n. 7 Negativo n. 15 Contaminazione n. 1

Tab. II: casistica e risultati per il test Xpert/CT/NG nella gestione delle urgenze in Clinica ostetrico-ginecologica

CASISTICA n. 10 M.C. P. 0.4	RISULTATI			
	Campione Sex di riferimento Esame colturale	Campione XpertMSRA	Metilfenacolo Sex di riferimento Aggi. rifampina	Metilfenacolo XpertMSRA
Età da 11.50 anni Sex: maschio malattia: sepsi Malattia: meningite malattia: TB				
Patologia n. 6 Negativo n. 1 P. 0.1 (patologia)	Positivo n. 6 Negativo n. 4 Contaminazione n. 1	Positivo n. 5 P. 0.1 (contaminazione) Negativo n. 1	Positivo n. 5 P. 0.1 (contaminazione) Negativo n. 1	Positivo n. 5 P. 0.1 (contaminazione) Negativo n. 1 Contaminazione n. 1

Tab. III: casistica e risultati per il test Xpert/MSRA/SA per la gestione delle sepsi stafilococciche in pazienti critici. Da notare che il criterio di meticillina-resistenza si può desumere dal test anche nelle sepsi sostenute da Stafilococchi coagulasi-negativi non -*S.aureus*

CASISTICA n. 12 F. 11 M.C. 1	RISULTATI		
	GBS Sex di riferimento Esame colturale (M76) o coniglio n. 24	GBS Sex di riferimento Esame colturale (M76) o coniglio n. 24 P. 0.1 (patologia)	XpertGBS
Età da 22.50 anni Sex: maschio malattia: TB			
Età da 27 anni Sex: maschio Malattia: meningite n. 10 P. 0.1 Malattia: sepsi peritoneale n. 1	Positivo n. 2 Negativo n. 7	Positivo n. 2 Negativo n. 7 Negativo n. 6	Positivo n. 2 Negativo n. 6 Contaminazione n. 1
Malattia: meningite (M76) n. 1 Malattia: sepsi peritoneale	Positivo n. 1		Positivo n. 1

Tab. IV: casistica e risultati per il test XpertGBS nella gestione delle urgenze in Clinica ostetrico-ginecologica e in un caso di meningite encefalite in un adulto.

\*: gli isolati di dubbia interpretazione sono stati identificati mediante tipizzazione di Lancefield.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

La concordanza tra il sistema GeneXpert e le metodiche microbiologiche convenzionali è stata del 100%, sia per quanto riguarda la corretta rivelazione del microorganismo target nel campione biologico che la corretta interpretazione di sensibilità/resistenza agli antibiotici testati (meticillina per *S.aureus*, rifampicina per *M. tuberculosis* complex.)

Questo consente in tempi incredibilmente rapidi (<= 2 ore) il tempestivo inquadramento diagnostico, isolamento, trattamento antibiotico del paziente.

Riteniamo però di enfatizzare anche i seguenti punti di forza:

- a. dal punto di vista tecnico
  - non sono richiesti spazi dedicati all'attività di biologia molecolare;
  - per la sua semplicità il test può essere eseguito da personale tecnico senza adeguata formazione su tecniche di biologia molecolare;
  - la parte tecnica è ridotta al trasferimento del campione in cartridge monotest senza pretrattamenti, per cui vengono superati problemi di errore di campione, cross-contaminazione, modalità di conservazione del campione fino all'esecuzione del test.
- b. dal punto di vista analitico
  - il test è una Real Time PCR dotata di uno o più controlli interni per la validazione analitica.
  - il processo di estrazione e amplificazione, completamente automatizzato, dura da 60 a 120 minuti effettivi per cui è concretamente utilizzabile per determinazioni di tipo urgente.
- c. dal punto di vista economico
  - a fronte dei molteplici benefici illustrati, il test ha un costo unitario confrontabile, se non inferiore, ad un test di biologia molecolare eseguito con metodiche convenzionali.