

**3° CONGRESSO NEWMICRO**  
...The need for speed: il  
laboratorio di Microbiologia e le  
Urgenze Infettive



## **Il laboratorio di microbiologia ed il processo di donazione e trapianto**

**Giovanni P. Gesu**  
Ospedale Niguarda Ca' Granda  
Milano



Padenghe sul Garda, 22 marzo 2013

# Nuovo cuore per la piccola Emma

La bimba aveva incontrato suo cane. Era in ospedale da un anno

08 marzo, 11:23



# Pre-transplant testing for infectious diseases

- “Transplants save lives”

- Moon H. Nahm, MD

- “Transplantation is a very easy way to spread infections. It offers direct inoculation from donor to recipient.”

- Moon H. Nahm, MD

# Rate of Viremia Undetected in Screening of Tissue Donors

<b>Virus (Antibody+)</b>	<b>Periodo Finestra (giorni) Anticorpi</b>	<b>Probabilità: Donazione in corso di viremia Anticorpi</b>
<b>HIV Ab</b>	<b>22</b>	<b>0.428-1.815</b>
<b>HBsAg/HBV</b>	<b>59</b>	<b>2.441-2.962</b>
<b>HCV Ab</b>	<b>70</b>	<b>0.942-2.374</b>
<b>HTLV Ab</b>	<b>51</b>	<b>0.780</b>

# Valutazione Pre-Trapianto: Donatore





## Criteria di NON-IDONEITA' ASSOLUTA

- • Sieropositività per HIV1 o 2
- • Sieropositività contemporanea per HBV ed HDV
- Neoplasia maligna in atto ad alto potenziale metastatico
- • Tubercolosi in atto
- • Infezioni sistemiche sostenute da microrganismi per i quali non esistono opzioni terapeutiche praticabili
- • Malattie da prioni accertate

# Frequency of tuberculosis among solid-organ transplant recipients

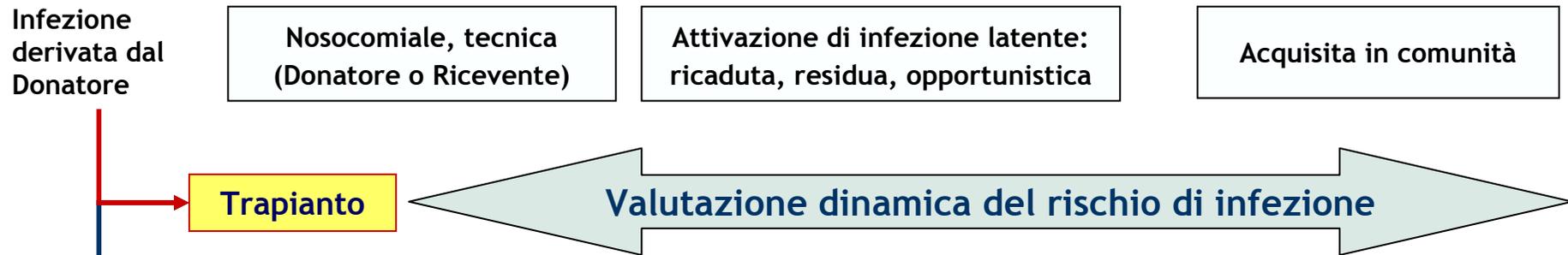
Variable	Solid-organ transplantation type					
	Overall	Pulmonary	Cardiac	Renal	Hepatic	Renal-pancreatic
Prevalence, %						
Literature <sup>a</sup>	1.2–6.4 <sup>b</sup>	2–6.5	1–1.5	0.5–15	0.7–2.3	...
GESITRA	0.45	1.15	0.26	0.35	0.47	0.85
Incidence, cases per 10 <sup>6</sup> inhabitants per year (95% CI 95): GESITRA						
	512 (317–783)	2072 (565–5306)	255 (6.5–1421)	358 (144–728)	541 (269–1065)	1204 (30.5–6710)

**NOTE.** Data from the Network for the Study of Infection in Transplant recipients (GESITRA) are from 2008.

<sup>a</sup> Data are from [1–4].

<sup>b</sup> Data shown are for developed countries; the prevalence in countries where tuberculosis is highly endemic was 15%.

# Sequenza temporale dinamica delle infezioni



## Infezioni comuni nel Ricevente di trapianto di organo

< 1 mese	da 1 a 6 mesi	> 6 mesi
<p><u>Infezioni da batteri resistenti agli antibiotici:</u>                      MRSA, VRE  <i>Candida species (non-albicans)</i>                      Aspirazione                      Infezione dai cateteri                      Infezione della ferita                      Perdite dall'anastomosi e ischemia                      Colite da <i>Clostridium difficile</i></p> <p><u>Infezioni derivate dal Donatore</u>                      (poco frequenti):                      HSV, LCMV, rhabdovirus (rabbia), West Nile virus, HIV, <i>Trypanosoma cruzi</i></p> <p><u>Infezioni derivate dal Ricevente</u>                      (colonizzazione):  <i>Aspergillus, Pseudomonas</i></p>	<p><u>Con profilassi per PCP e antivirale (CMV, HBV):</u>                      Infezione da Polyomavirus BK con nefropatia                      Colite da <i>C. difficile</i>                      Infezione da HCV                      Infezione da Adenovirus, Influenza  <i>Cryptococcus neoformans</i>  <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                      Complicanze anastomotiche</p> <p><u>Senza profilassi:</u>                      Pneumocystis                      Infezione da herpesvirus (HSV, VZV, CMV, EBV)                      Infezione da HBV                      Infezione da listeria, nocardia, toxoplasma, strongyloides, leishmania, <i>T. cruzi</i></p>	<p>Polmonite di comunità                      Infezione urinaria                      Infezione da <i>Aspergillus</i> e altre muffe, <i>Mucor</i>                      Infezione da Nocardia                      Rhodococcus species</p> <p><u>Infezioni virali tardive:</u>                      Infezione da CMV (colite e retinite)                      Epatite (HBV, HCV)                      Encefalite da HSV</p> <p><u>Infezioni virali acquisite in comunità</u> (SARS, West Nile virus)                      Infezione da Polyomavirus JC (PML)                      Neoplasie della cute,                      Linfoma (PTLD)</p>



- **Esami Colturali**

- **Esami colturali: sangue, urine, escreato**

- **anche in assenza di segni clinici di infezione, il giorno della donazione**

- **i risultati, anche preliminari, dovranno essere trasmessi tempestivamente al Centro Regionale**

Es. colturale	Negativo	Positivo
Escreato	48 h	48-72 h
Urine	24 h	48 - 72 h
Sangue	120 - 168 h	24 - 48 - 72 h

# Principles and Procedures for Blood

## C 7.1.3 Preliminary Written Results

The following may serve as examples of specimen status reports:

- blood culture ordered, specimen not received;
- testing in progress, no results to date;
- no growth at 24 hours; ←
- no growth at 48 hours; and ←
- positive blood culture. ←

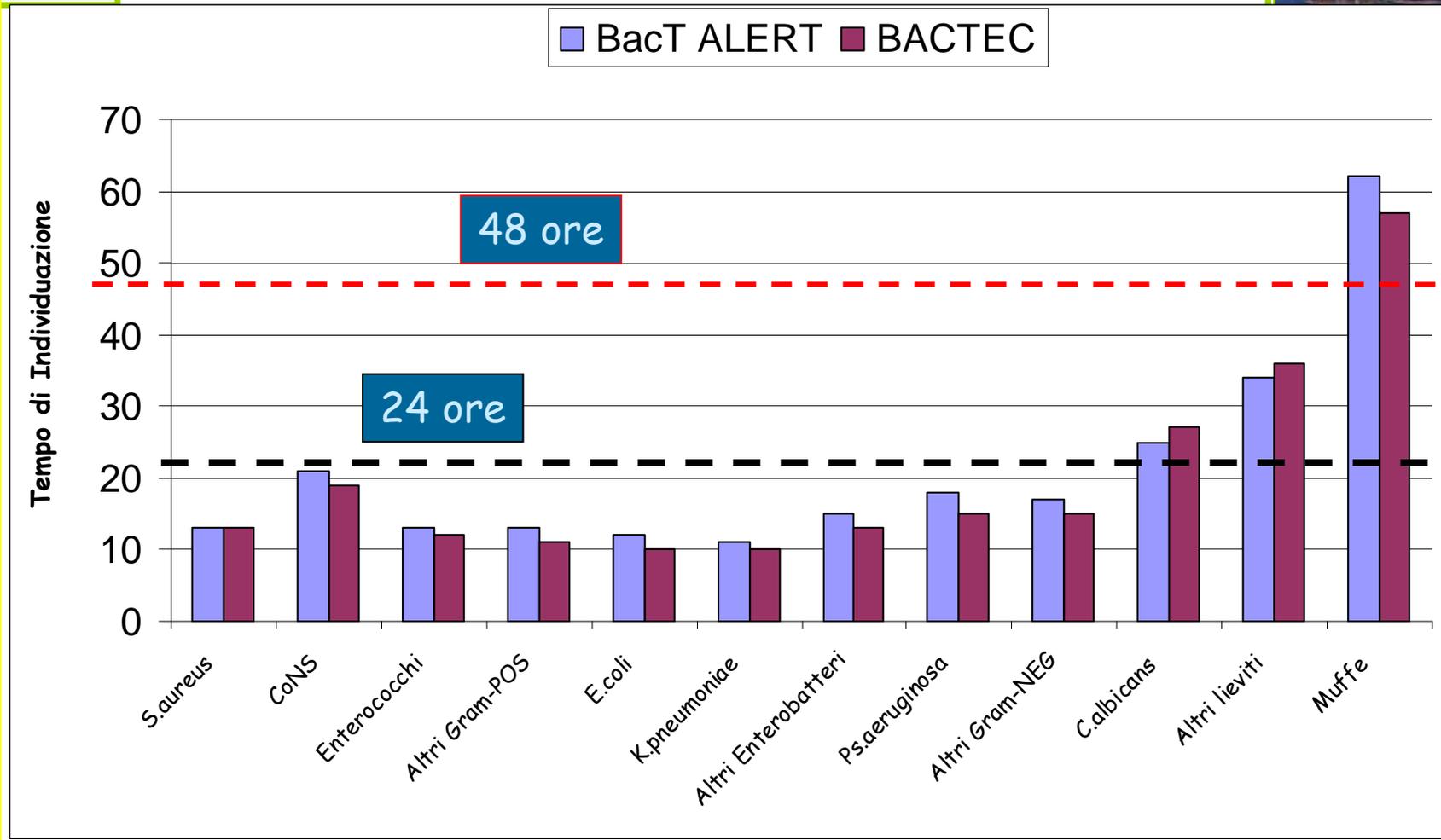


**CLINICAL AND  
LABORATORY  
STANDARDS  
INSTITUTE®**

**Approved Guideline**  
May 2007

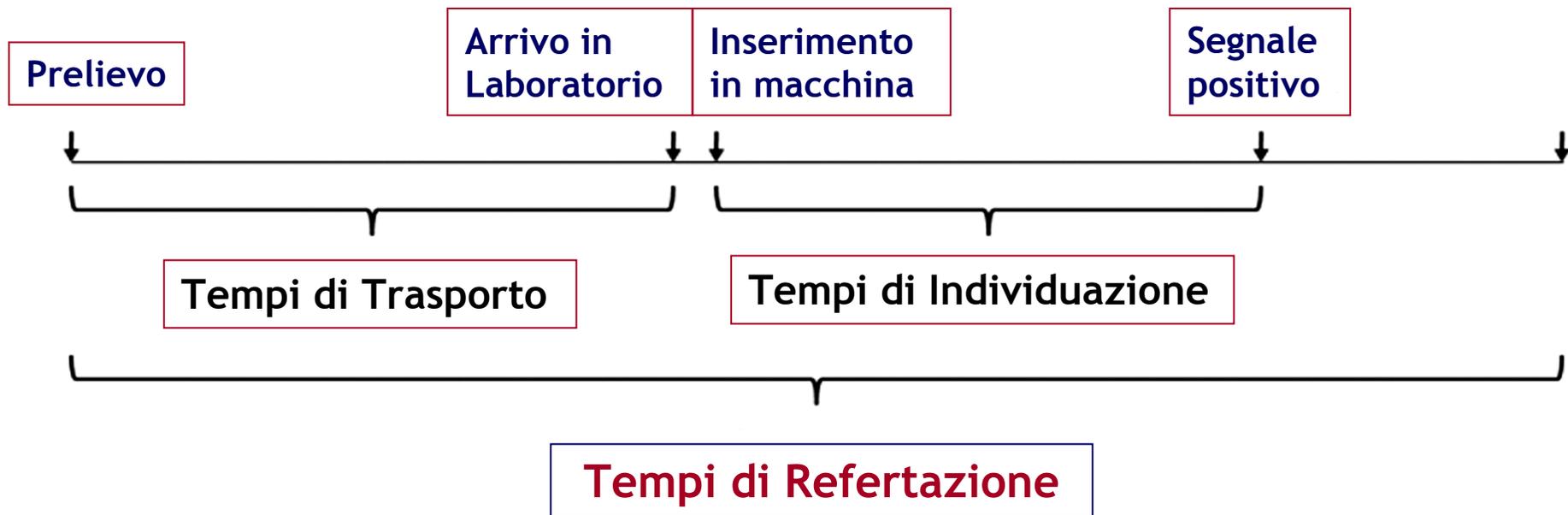


# Emocolture a Monitoraggio Continuo: Tempi medi di Individuazione



# Emocolture

## Timeline e Impatto organizzativo



Trasporti automatici?  
Posta pneumatica?  
Strumenti in Reparto?

Strumento  
accessibile h24?

Conservazione?  
Pre-incubazione?

## Emocolture:

# Per quanto tempo conservarle?

- **Cumitech 1B**

- Vanno inviate ASAP per evitare ogni ritardo nella positivizzazione

- ***The Manual of Clinical Microbiology* (8th ed.)**

- Tempo di conservazione massimo di 2 h

- **BacT/ALERT (package insert)**

- In macchina immediatamente dopo l'inoculo

- **BacT/ALERT (memo to customers - Randy Turner, bioMérieux)**

- Conservabili a 25°C fino a massimo 24 h

- **BD Diagnostics (Mike Borlet, BD Diagnostics)**

- BACTEC Aerobic/F Plus and LYTIC/10 Anaerobic bottles
- Conservabili a temperatura di incubatore (non meglio specificata) per 20h oppure a T Ambiente fino a 48 h

# Effects of Delayed-Entry Conditions on the Recovery and Detection of Microorganisms from BacT/ALERT and BACTEC Blood Culture Bottles

R. L. Sautter,<sup>1†</sup> A. R. Bills,<sup>1</sup> D. L. Lang,<sup>1</sup> G. Ruschell,<sup>1</sup> B. J. Heiter,<sup>2</sup> and P. P. Bourbeau<sup>2\*</sup>

*Pinnacle Health Laboratories, Harrisburg,<sup>1</sup> and Geisinger Medical Center, Danville,<sup>2</sup> Pennsylvania*

- Temperature

- 4°C
- T Ambiente (TA)
- 37°C
- **TA (2h) poi 37°C**

- Falsi Negativi

- 3
- 11
- 21
- **27**

- Tempi di ritardo

- 4h
- 12h
- **24h**

- Falsi Negativi

- 4
- 8
- **50**

# Effects of Delayed-Entry Conditions on the Recovery and Detection of Microorganisms from BacT/ALERT and BACTEC Blood Culture Bottles

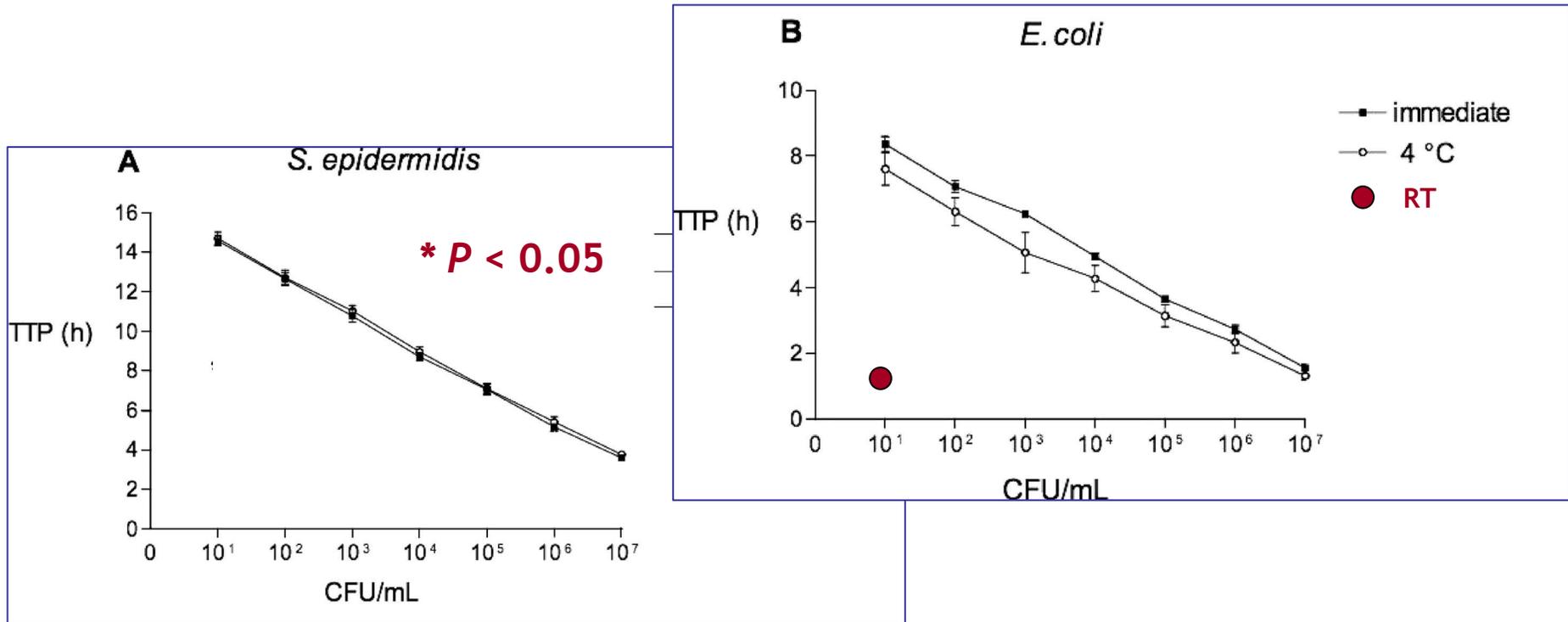
R. L. Sautter,<sup>1†</sup> A. R. Bills,<sup>1</sup> D. L. Lang,<sup>1</sup> G. Ruschell,<sup>1</sup> B. J. Heiter,<sup>2</sup> and P. P. Bourbeau<sup>2\*</sup>

*Pinnacle Health Laboratories, Harrisburg,<sup>1</sup> and Geisinger Medical Center, Danville,<sup>2</sup> Pennsylvania*

**TABLE 4. False-negative results as a function of holding time and holding temperature**

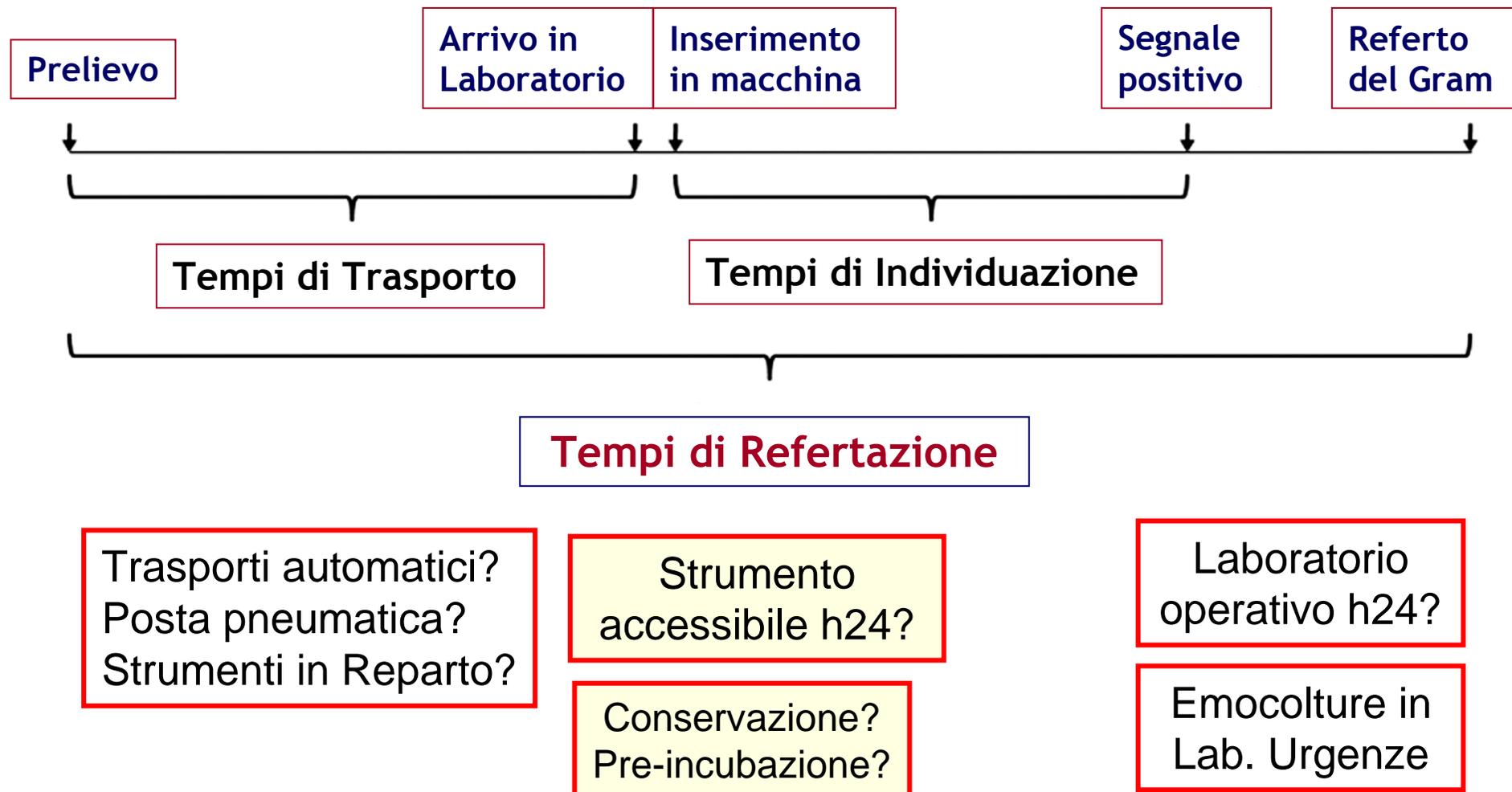
Holding temp (°C)	No. of false-negative results at holding time of:		
	4 h	12 h	24 h
4°C	1	0	2
RT	1	4	6
37°C	0	2	19
TR	2	2	23

# Influence of Storage Temperature of blood samples on TTP



# Emocolture

## Timeline e Impatto organizzativo



**Batteriemia / Sepsi ( T<sub>0</sub> )**

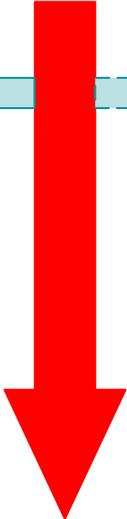
PCR Diretta



PCR-ESI MS

Film array

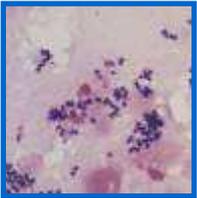
Microarray



**Emocoltura Positiva ( T<sub>0</sub> + ??h )**



**Gram diretto (5 min)**



Cocchi Gram-positivi (stafilococchi)

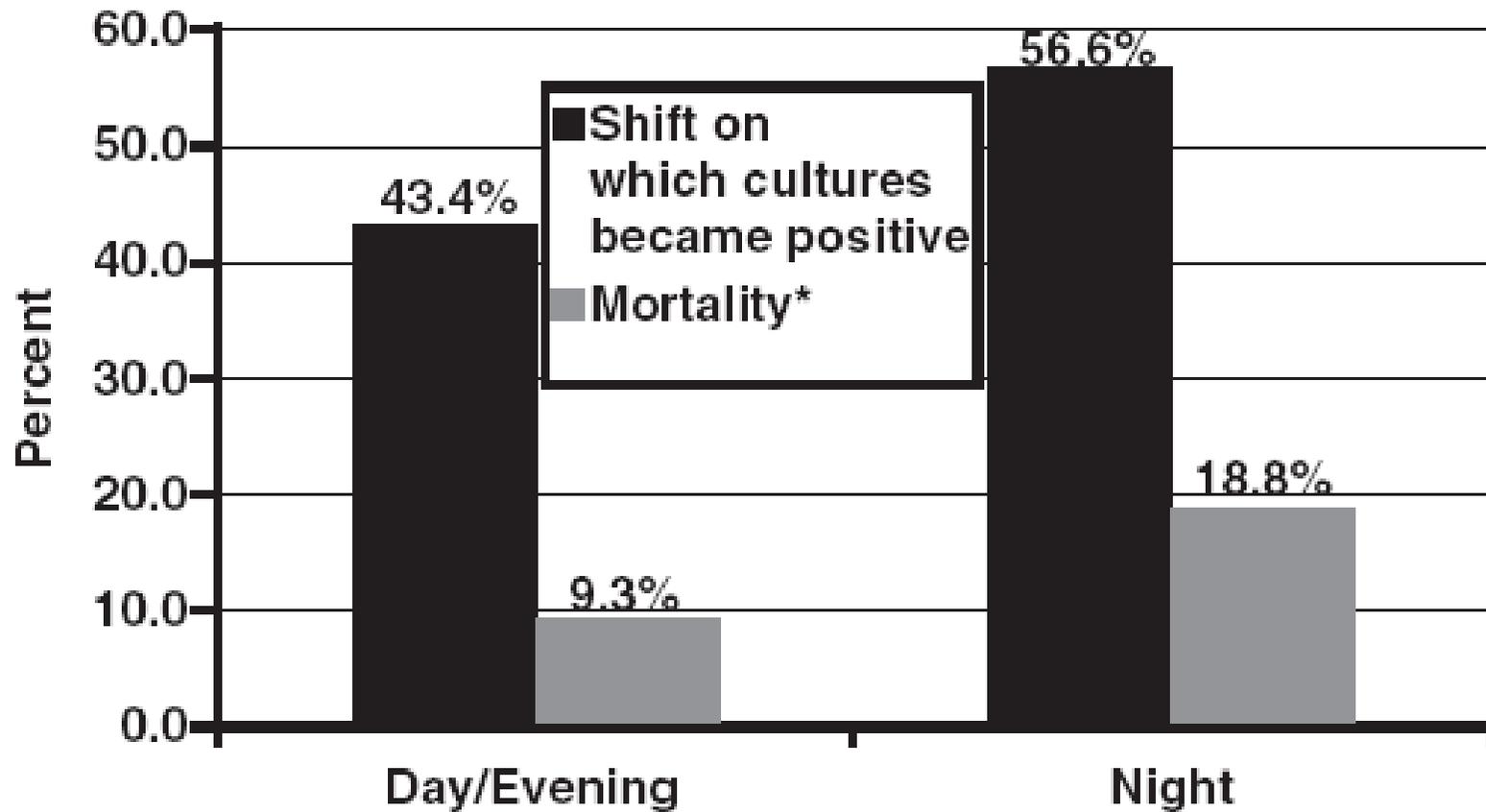


Bacilli Gram-negativi



Miceti lievitifirmi

# Decreased Mortality Associated With Prompt Gram Staining of Blood Cultures





## Criteria generali per la valutazione di idoneità del donatore

### Criteria di NON-IDONEITA' ASSOLUTA

- Sieropositività per HIV1 o 2
- Sieropositività contemporanea per HBV ed HDV
- Neoplasia maligna in atto ad alto potenziale metastatico
- Tubercolosi in atto
- ➔ • **Infezioni sistemiche sostenute da microrganismi per i quali non esistono opzioni terapeutiche praticabili**
- Malattie da prioni accertate

# Carbapenemasi di tipo KPC

## Italia 2010



Antibiotic	MIC mg/L(S/I/R)
Amp/Sulb	>32 R
Pip/Tazo	>128 R
Ceftriaxone	>64 R
Ceftazidime	>64 R
Cefepime	>64 R
Ertapenem	>32 R
Imipenem	>32 R
Meropenem	>32 R
Aztreonam	>64 R
Amikacin	>64 R
Gentamicin	2 S
Tobramycin	>16 R
Ciprofloxacin	>4 R
Fosfomicin	32 S
Tigecycline	1 S
Colistin	0.4 S

slide courtesy of G. Rossolini

# Resistenza ai Carbapenemi in *K. pneumoniae*



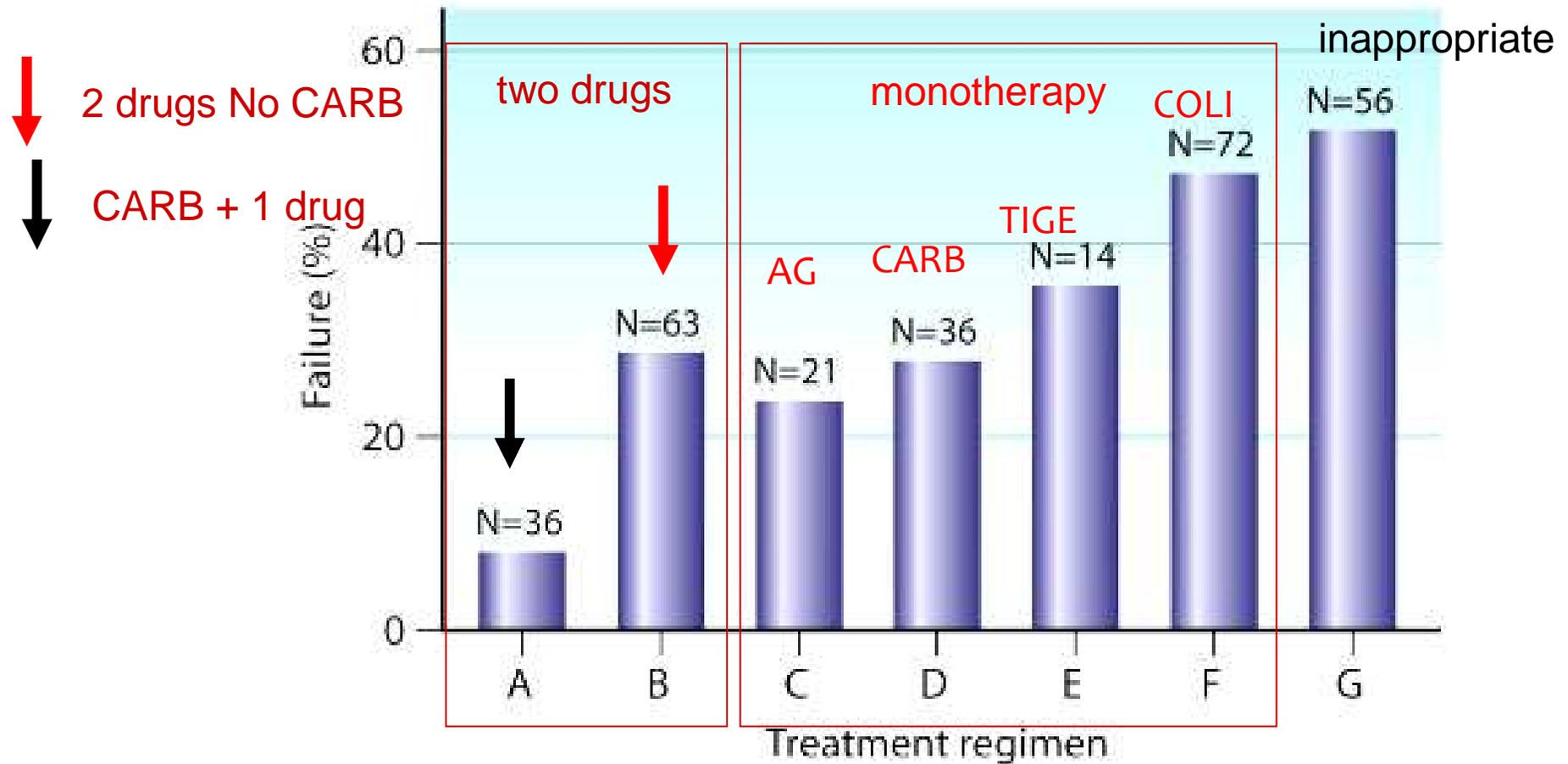
**Sorveglianza 2011**  
**(1964 isolati di *K. pneumoniae* da 25 centri)**

◆ *K. pneumoniae* CR trovata in 23 centri su 25 (234 isolati)

**95% erano produttori di carbapenemasi**

**87% KPC, 7% VIM, 1% OXA-48**

# Outcomes of infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, according to treatment regimen



# Graft-Site Candidiasis after Kidney Transplantation

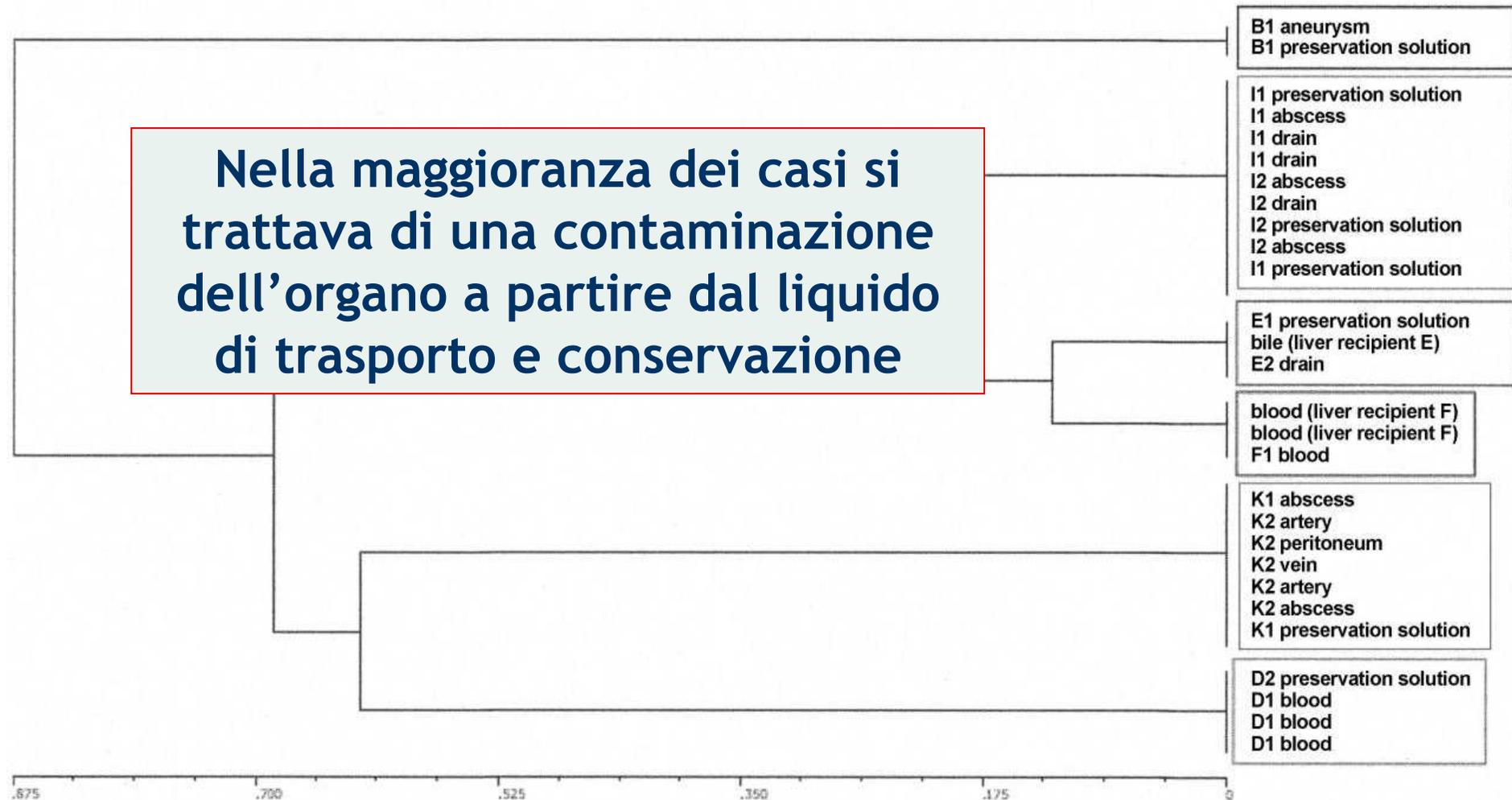
- Studio retrospettivo (9 anni) su 18.671 KT
  - 18 riceventi da 12 donatori → 1 caso per 1000 trapianti
  - Coltura sistematica dei liquidi di conservazione
    - Specie implicata: *Candida albicans* (13 casi)
- Clinicamente
  - Arterite renale (14 casi)
  - Ascesso del trapianto (2 casi)
  - Infezione del sito chirurgico (1 caso)
  - Urinoma (1 caso)
- Esito:
  - Decesso (3 casi)
  - Espianto (9 casi)



# Graft-Site Candidiasis after Kidney Transplantation



**Nella maggioranza dei casi si trattava di una contaminazione dell'organo a partire dal liquido di trasporto e conservazione**

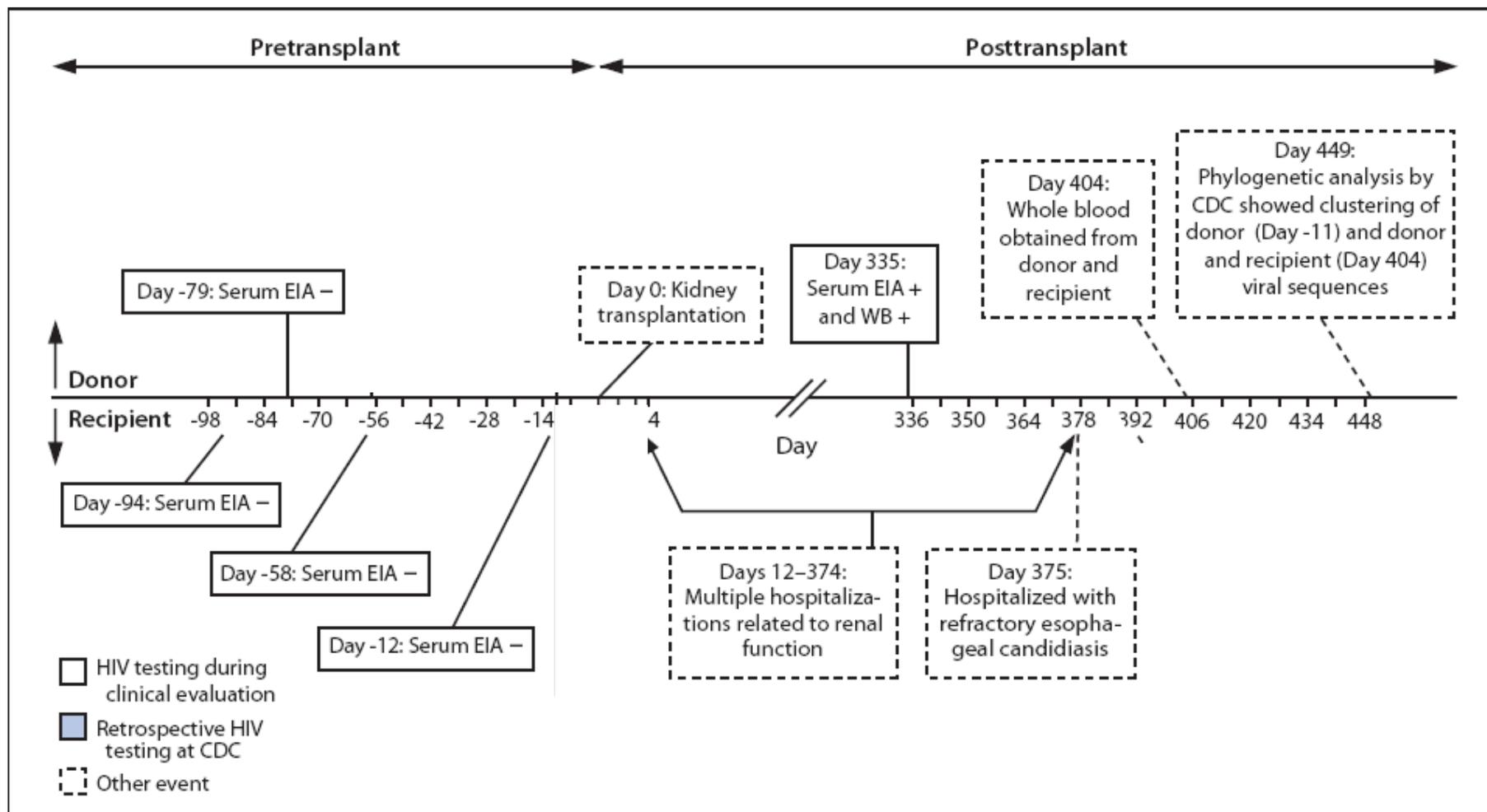


**BioMICS UPGMA tree [from file: 1911.txt]**  
Cophenetic Coef. Corr.: 0.967; n obs.: 378; DF: 377; T value: 73.85; ND P: 0.000000; DP: 0.000000

# Valutazione sierologica/virologica del potenziale donatore d'organi

- Indagini il cui risultato deve essere disponibile per la valutazione di idoneità del donatore
  - Anticorpi anti-HIV-1, 2
  - Anticorpi anti-HCV
  - HBsAg, HBsAb, HBcAb
  - Sierologia Lue
    - Test treponemico
- Indagini biomolecolari supplementari da effettuare a donatori per i quali l'anamnesi, l'esame obiettivo o i risultati di esami di laboratorio facciano emergere dubbi
  - HIV-RNA
  - HCV-RNA
  - HBV-DNA
  - HDV-RNA

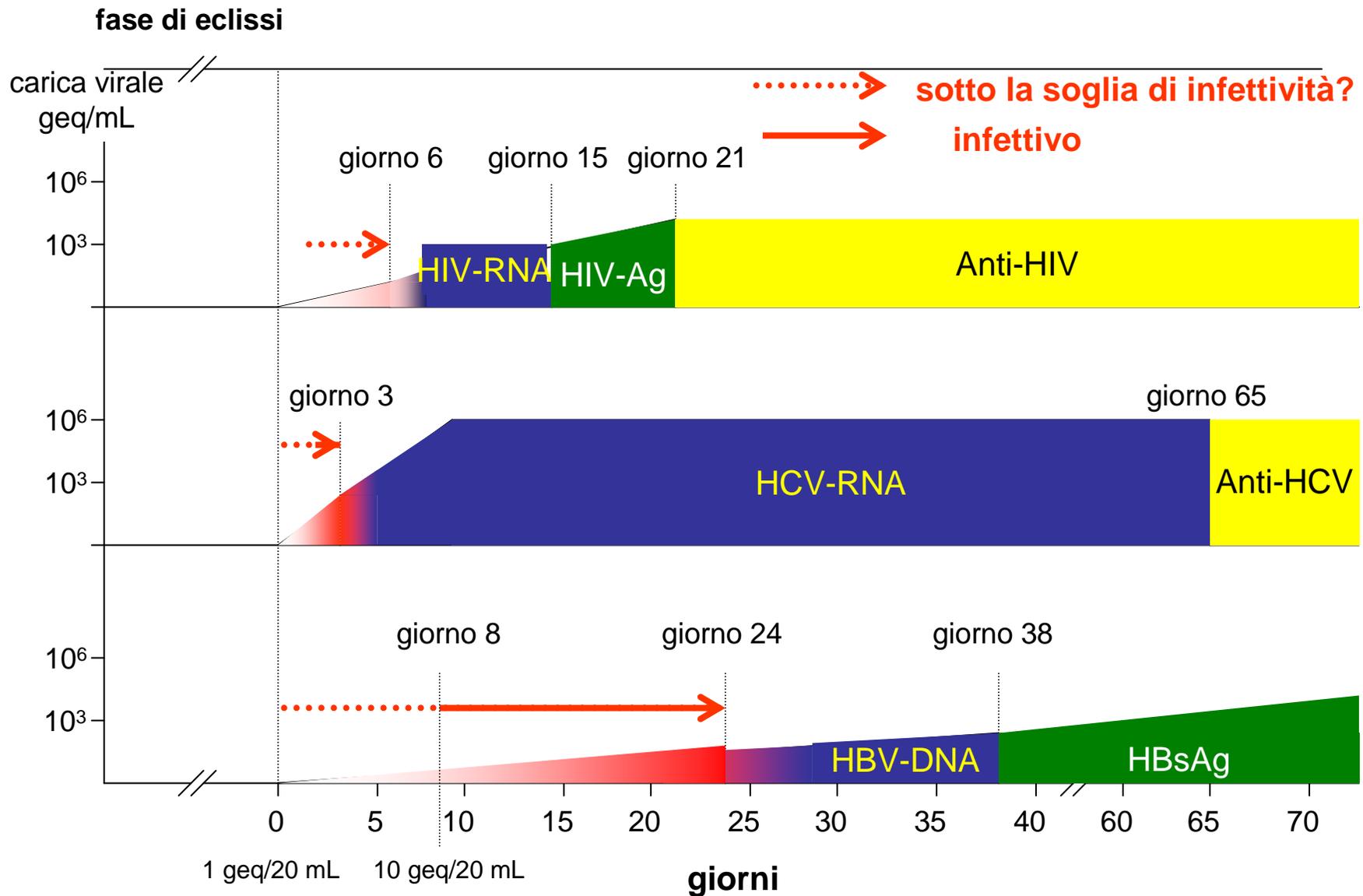
## HIV Transmitted from a Living Organ Donor — New York City, 2009



# Trasfusioni vs. Trapianti: Fattori che Aumentano il Rischio

- Elementi anamnestici limitati:
  - Generalmente acquisiti dai familiari o da amici in una situazione estremamente dolorosa
- Informazioni necessariamente limitate per
  - Storia di viaggi
  - Esperienze sessuali
  - Esposizioni ad animali o insetti
  - ...

# Closing the “Infectious Window”



# NAT (Nucleic Acid Testing)

- Il “periodo finestra” per i test sierologici va da meno di un mese (per HIV) a 2 mesi o più (per HBV e HCV)
- La NAT può ridurre la finestra a circa 2 settimane (per HBV a circa 1 mese)
- L’uso della NAT è stato introdotto in alcuni ambiti
  - per ridurre il periodo finestra
  - aumentare la sicurezza
  - permettere un maggiore utilizzo di organi e tessuti



# La NAT...

## Voi come la vedete?

- **Problema:**

- Avete una grande piscina e sospettate che alcune rane vi abbiano depresso le uova
- Disponete di un secchio... (il campione prelevato)
- e di un colino... (il test NAT)



- **Soluzione:**

- Prelevate un secchio di acqua dalla piscina
- Immergete il colino nel secchio e...
  1. Se niente resta nel colino concludete che non ci sono uova di rana in piscina
  2. Se qualcosa resta nel colino concludete che sono uova

## Il colino...

# Test biomolecolari: Diversi usi

- Monitoraggio: valutare l'andamento nel tempo di uno o più parametri e/o la risposta alla terapia
  - Soggetti HIV-positivi in terapia anti-retrovirale
- Diagnosi: differenziare malattia/non malattia o tra diverse patologie
  - Pazienti in fase precoce di infezione
- Screening: identificare soggetti con malattia / evento in una popolazione di "sani"
  - Donatori di sangue



# Il colino ?

## NAT per monitoraggio

### DENOMINAZIONE

Abbott RealTime™ HIV-1



### FINALITÀ D'USO

Abbott RealTime HIV-1 è un dosaggio *in vitro* basato sul principio della RT-PCR (trascrizione inversa-reazione a catena della polimerasi) per la determinazione quantitativa del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) in campioni di plasma umano ottenuti da **soggetti con infezione da HIV-1**. Il dosaggio Abbott RealTime HIV-1 viene usato congiuntamente alla valutazione del quadro clinico e di altri marker di laboratorio quale indicatore prognostico della malattia, nonché come ausilio nella valutazione della risposta virale al trattamento antiretrovirale, misurata in base ai cambiamenti dei livelli di HIV-1 RNA nel plasma. **Il presente dosaggio non è da utilizzare come test di screening per l'HIV-1 o come test diagnostico per confermare la presenza di infezione da HIV-1.**



### Sensibilità

68 UI/mL per volume del campione di 1,0 mL  
127.5 UI/mL per volume del campione di 0,5 mL  
255 UI/mL per volume del campione di 0,2 mL



# Il colino ?

## NAT per monitoraggio

**COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®  
HIV-1 Test, version 2.0**

LOW 3  
**cobas®**

Roche Diagnostics GmbH  
D-68298 Mannheim

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®  
HIV-1 Test, v2.0

**HI2CAP**

48 Tests

P/N: 05212294 190

### USO PREVISTO

Questo test è destinato ad essere utilizzato contestualmente alla documentazione clinica e ad altri marker di laboratorio come indicatore del progresso della malattia ai fini della gestione clinica dei pazienti affetti da HIV-1 Gruppo M e HIV-1 Gruppo O. Il test può essere utilizzato sia per valutare la prognosi dei pazienti mediante misurazione del livello di RNA dell'HIV-1 di riferimento, sia per monitorare gli effetti della terapia antiretrovirale mediante misurazione delle variazioni dei livelli di RNA dell'HIV-1 nel plasma con EDTA nel corso del trattamento antiretrovirale.

**Il test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 non è destinato all'uso né come test di screening della presenza dell'HIV-1 nel sangue o negli emoderivati, né come test diagnostico per la conferma dell'infezione da HIV-1.**

## Il colino!

### Screening Molecolare per la valutazione di idoneità del donatore di sangue

- Sistema di validazione delle Unità di emocomponenti
- Tempo tecnico di esecuzione: 4-5 ore
- Esecuzione contemporanea di:
  - Test combinato HIV-HCV-HBV
  - Test in singolo per:
    - HIV-RNA (20 UI/mL)
    - HCV-RNA (3 UI/MI)
    - HBV-DNA (7-10 UI/mL)

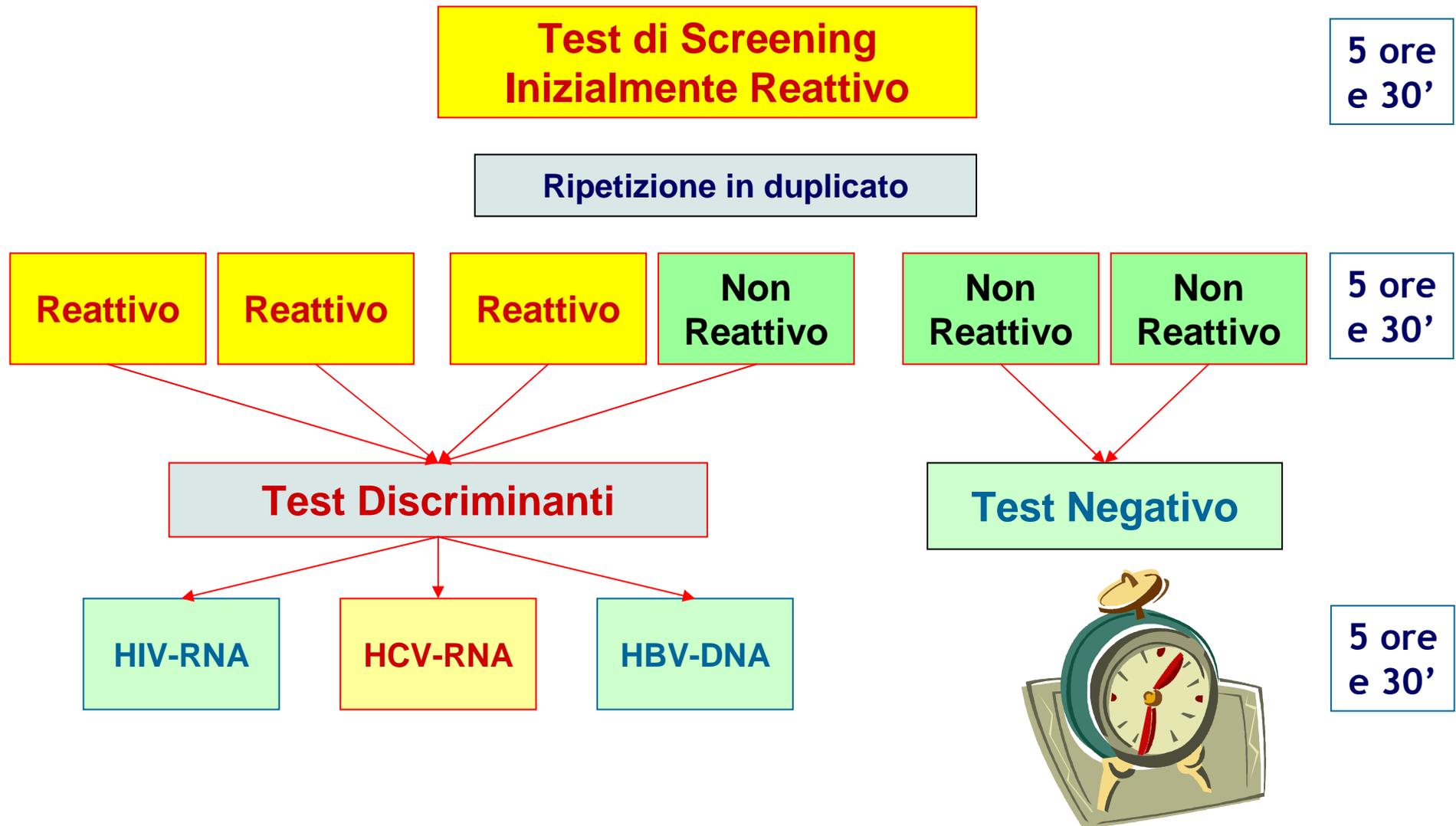


# Trasfusione di Sangue e derivati e Trapianto di Organi/Tessuti

- Significative similitudini riguardo a specifici patogeni
- Metodi per test di patogeni trasmessi dal trapianto di organi
- I **tempi** del trapianto di organo sono **molto più rapidi** dei tempi del trasfusionale
- Ciò che si richiede al test spesso è differente
  - **Test trasfusionale**
    - → altissima sensibilità
    - → **specificità?? (se ho un falso positivo elimino le sacche donate...)**
  - **Test per donazione di organi**
    - → altissima sensibilità
    - → **specificità?? (se ho un falso positivo PERDO un donatore...)**

# Test Tri-NAT su Donatori di Sangue

## Procedura Standard



# Test Tri-NAT su Donatori di Organi Procedura Standard (Niguarda)

Test di  
Screening

Test di  
Screening

Discriminante  
HIV

Discriminante  
HCV

Discriminante  
HBV

5 ore  
e 30'



## Test Tri-NAT Positivi su Donatori di Sangue

	Test eseguiti	HIV-RNA		HCV-RNA		HBV-DNA	
<b>2001</b>	13 426	0	-	1	0.007%	nd	-
<b>2002</b>	54 715	6	0.011%	9	0.016%		
<b>2003</b>	68 931	4	0.006%	15	0.022%		
<b>2004</b>	70 317	7	0.010%	17	0.024%		
<b>2005</b>	70 369	4	0.006%	10	0.014%		
<b>2006</b>	17 820	5	0.007%	24	0.035%		
	51 604						
<b>2007</b>	68 519	0	-	4	0.006%	21	0.031%
<b>2008</b>	69 334	6	0.009%	9	0.013%	12	0.017%
<b>2009</b>	68 888	5	0.007%	9	0.013%	16	0.023%
<b>2010</b>	70 909	5	0.007%	5	0.007%	8	0.011%
<b>2011</b>	71 574	1	0.001%	3	0.004%	13	0.018%

# Problemi legati all'uso della NAT

- Aumento significativo del TAT
  - Rischio di perdita di donatori
  - Aumento del tempo di ischemia a freddo
- Costi aggiuntivi significativi
  - Legati al test
  - Legati al trasporto dei campioni
- Rischio legato alla perdita di donatori per risultati falsamente positivi
  - Più probabili quando il rischio di malattia è basso

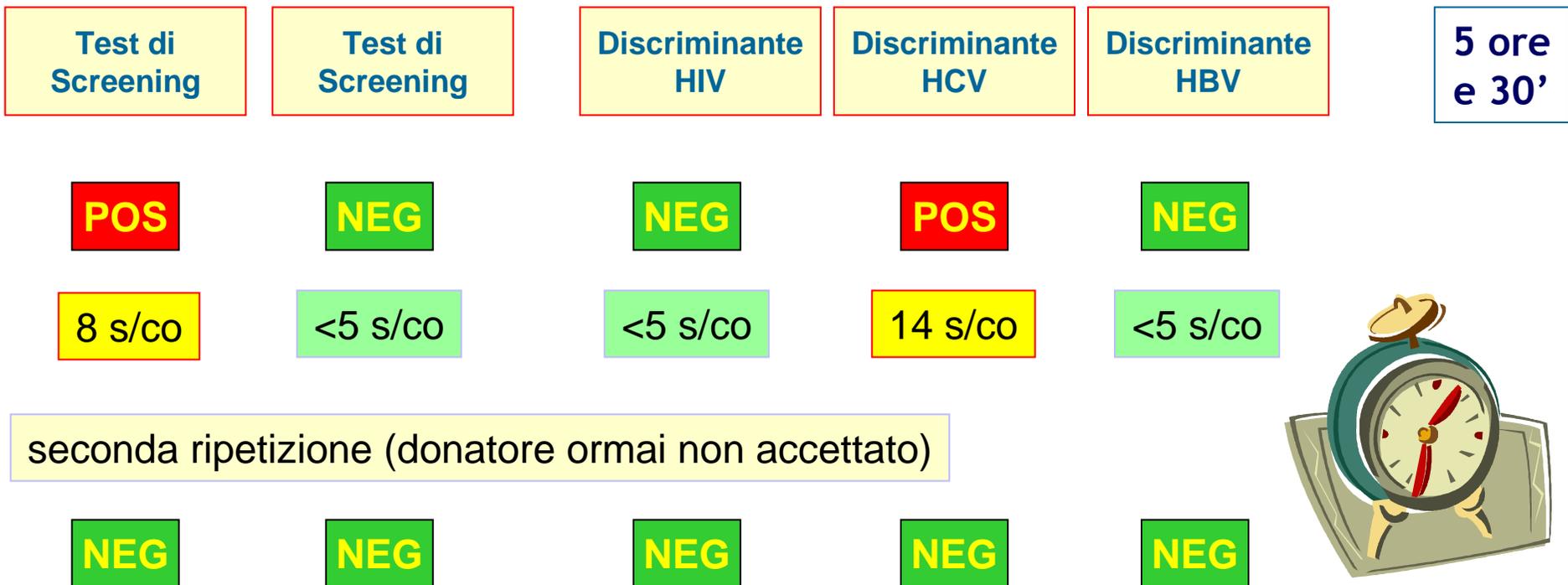
# Test Tri-NAT su Donatori di Sangue

## Frequenza di Test Inizialmente Reattivi

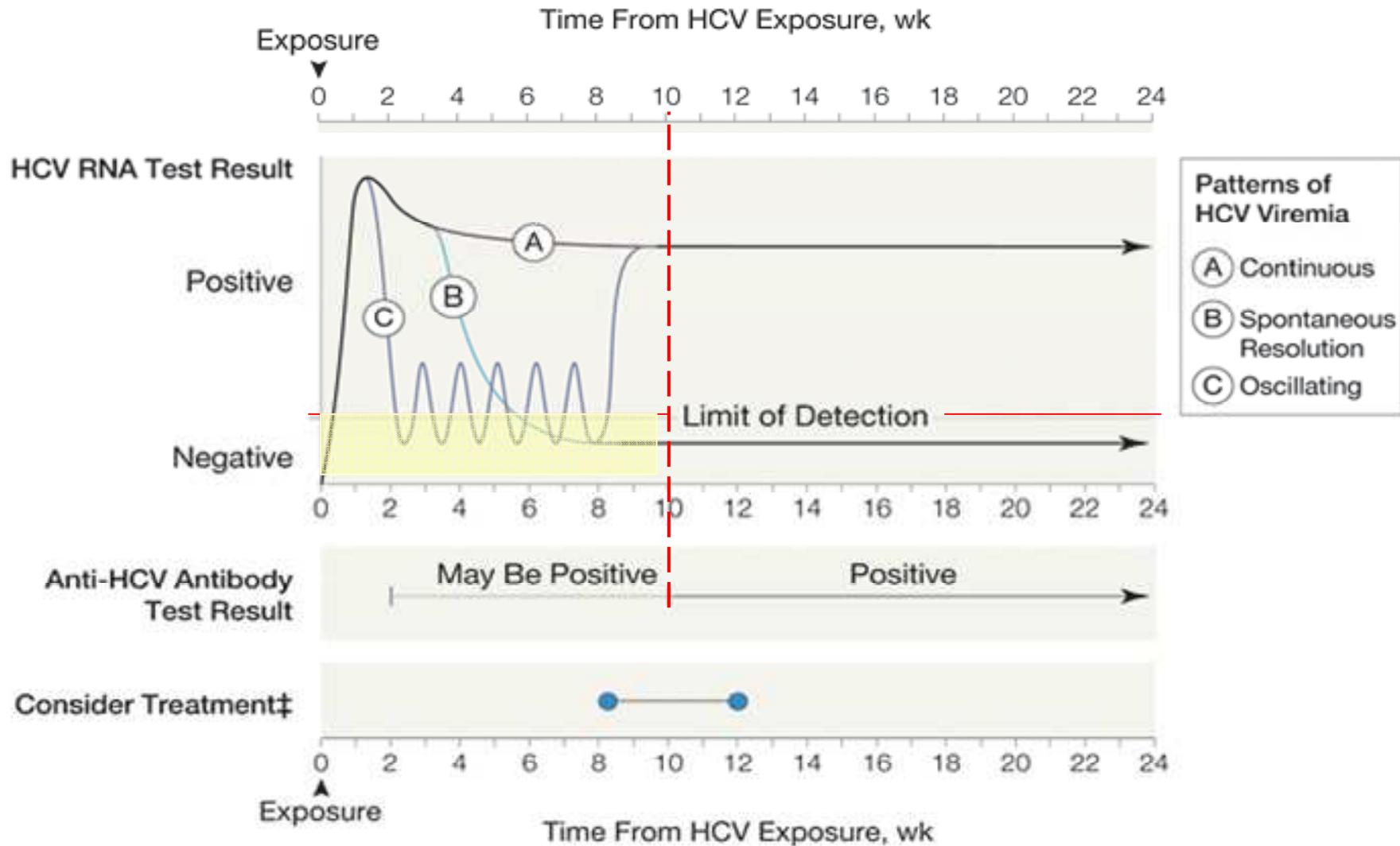
“qualcosa” rimane nel colino....

	Test eseguiti	HIV	HCV	HBV	Inizialmente Reattivi	% I.R.	% Confermati
<b>2001</b>	13 426	0	1	nd	9	0.07%	11.1%
<b>2002</b>	54 715	6	9		76	0.14%	19.7%
<b>2003</b>	68 931	4	15		125	0.18%	15.2%
<b>2004</b>	70 317	7	17		148	0.21%	16.2%
<b>2005</b>	70 369	4	10		245	0.35%	5.7%
<b>2006</b>	17 820	1	5		26	0.15%	23.1%
	51 604	4	19	16	201	0.39%	19.4%
<b>2007</b>	68 519	0	4	21	207	0.30%	12.1%
<b>2008</b>	69 334	6	9	12	115	0.17%	23.5%
<b>2009</b>	68 888	5	9	16	104	0.15%	28.8%
<b>2010</b>	70 909	5	5	8	78	0.11%	23.1%
<b>2011</b>	71 574	1	3	13	66	0.09%	25.8%

# Test Tri-NAT su Donatori di Organi Procedura Standard (Niguarda)



# Diagnosi Molecolare di Infezione da HCV



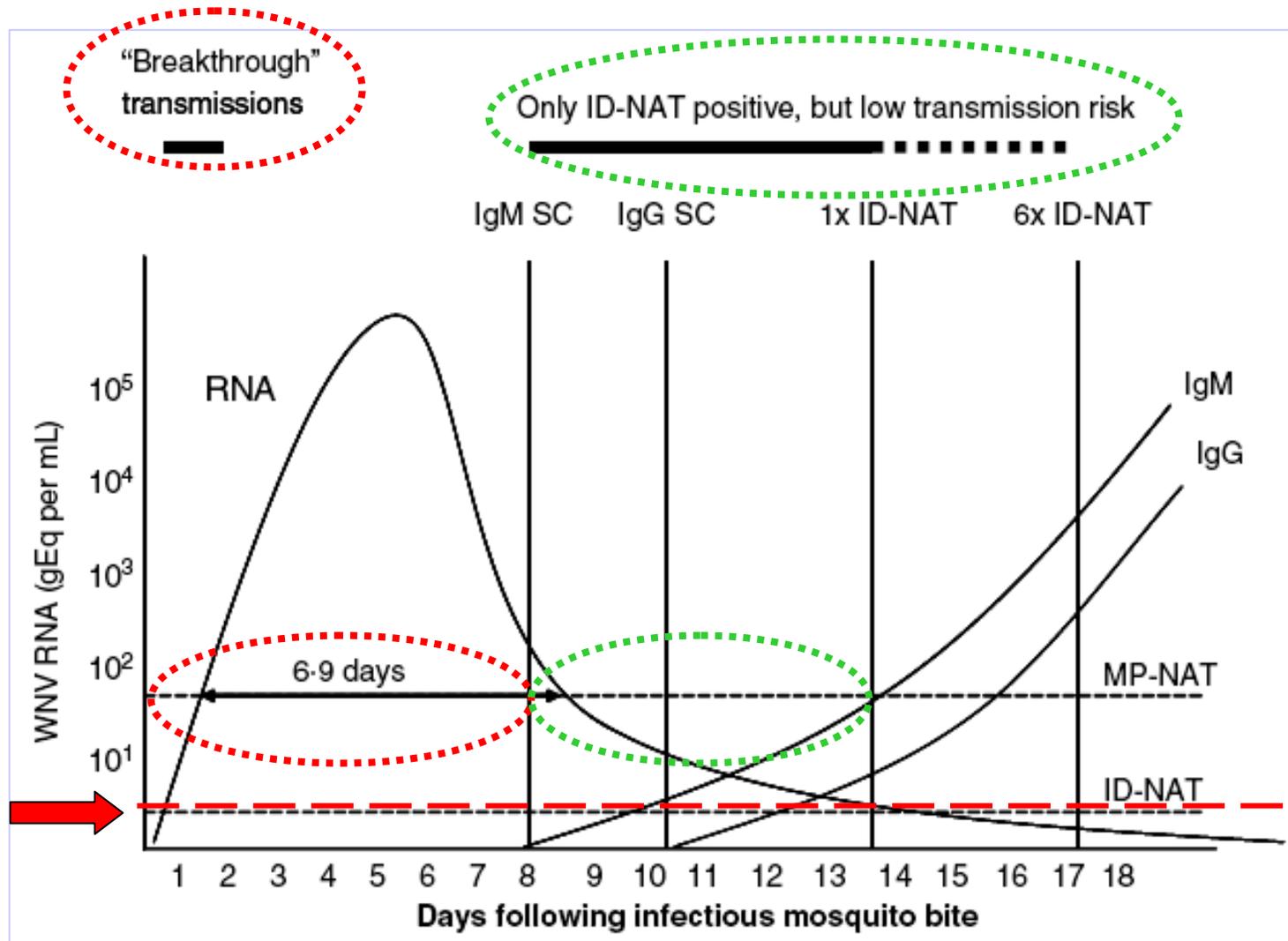
# Infezioni Inattese derivate dal Donatore

- In generale sono caratterizzate da:
  - Maggiori difficoltà di saggio
  - Tempi di dosaggio (TAT) più lunghi
  - Minore disponibilità di test biomolecolari e di altri test diagnostici
  - Limiti nel campione clinico del donatore da utilizzare (siero, tessuti, ecc.) per il test

# Esempi di Infezioni Inattese derivate dal Donatore

Patogeno	Anno
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Molti casi segnalati
Arenavirus (nuovo virus)	2007
HIV	Molti prima dello screening iniziato nel 1985; nessuno in 20 anni fino al 2007
HCV	2000 e 2007
Virus della Coriomeningite Linfocitaria	2003, 2005, 2008
Rabbia	2004 e 2005
Virus del West Nile	2002
<i>Plasmodium</i> sp. (malaria)	Molti casi segnalati
<i>Trypanosoma cruzi</i> (malattia di Chagas)	2001 e 2006

# Time-course of West Nile viraemia and antibody development in humans



ORIGINAL ARTICLE

## Transmission of West Nile Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients

Patient	Date Specimen Collected	Specimen Tested	Test Facility	WNV Test Results†	Clinical Diagnosis	Vital Status
Organ donor	7/30/02	Pre-transfusion serum	CDC	Negative PCR and WNV IgM	WNV viremia	Died; death not related to West Nile virus
	7/31/02	Post-transfusion serum	CDC	Negative PCR and WNV IgM		
	8/1/02	Post-transfusion serum	CDC	Positive PCR and viral culture		

**Il donatore aveva ricevuto emotrasfusioni da 63 donatori.**

**Una revisione dei donatori di sangue e i test di follow-up identificarono un donatore che aveva una viremia da West Nile virus (WNV) al momento della donazione e che divenne sieropositivo con IgM anti-WNV nei successivi due mesi**

# Conclusioni...

*...we should realize that the screening of organs for pathogens is about **risk mitigation** and not about risk elimination.*

*It is unlikely we will eliminate the risk associated with t*



*to completely transmission.*

*Such a goal is unrealistic with present technology.*

# Nuovo cuore per la piccola Emma

La bimba aveva incontrato suo cane. Era in ospedale da un anno

08 marzo, 11:23

