

**A COLAZIONE CON ... ADA : ... A STRATEGY TO CHALLENGE TIME**

**“Go FISHing?” - Dott.ssa Lucia Collini  
3° Congresso NewMicro – 21 marzo 2013**



**Why do PCR?  
Just go FISHing!**

## ***Diagnosi di sepsi***

Si basa :

su sistemi di classificazione dei sintomi e dei segni clinici,

sul dosaggio di *biomarker* correlati alla sepsi,

sull'identificazione del microrganismo responsabile.



La rapida identificazione dell'agente infettivo è di importanza cruciale per l'instaurarsi di un adeguato trattamento antimicrobico e per l'esito della malattia.

Il ritardo o il fallimento nelle procedure diagnostiche portano ad un trattamento inadeguato nel 25% dei casi, con un significativo aumento del rischio di morte.

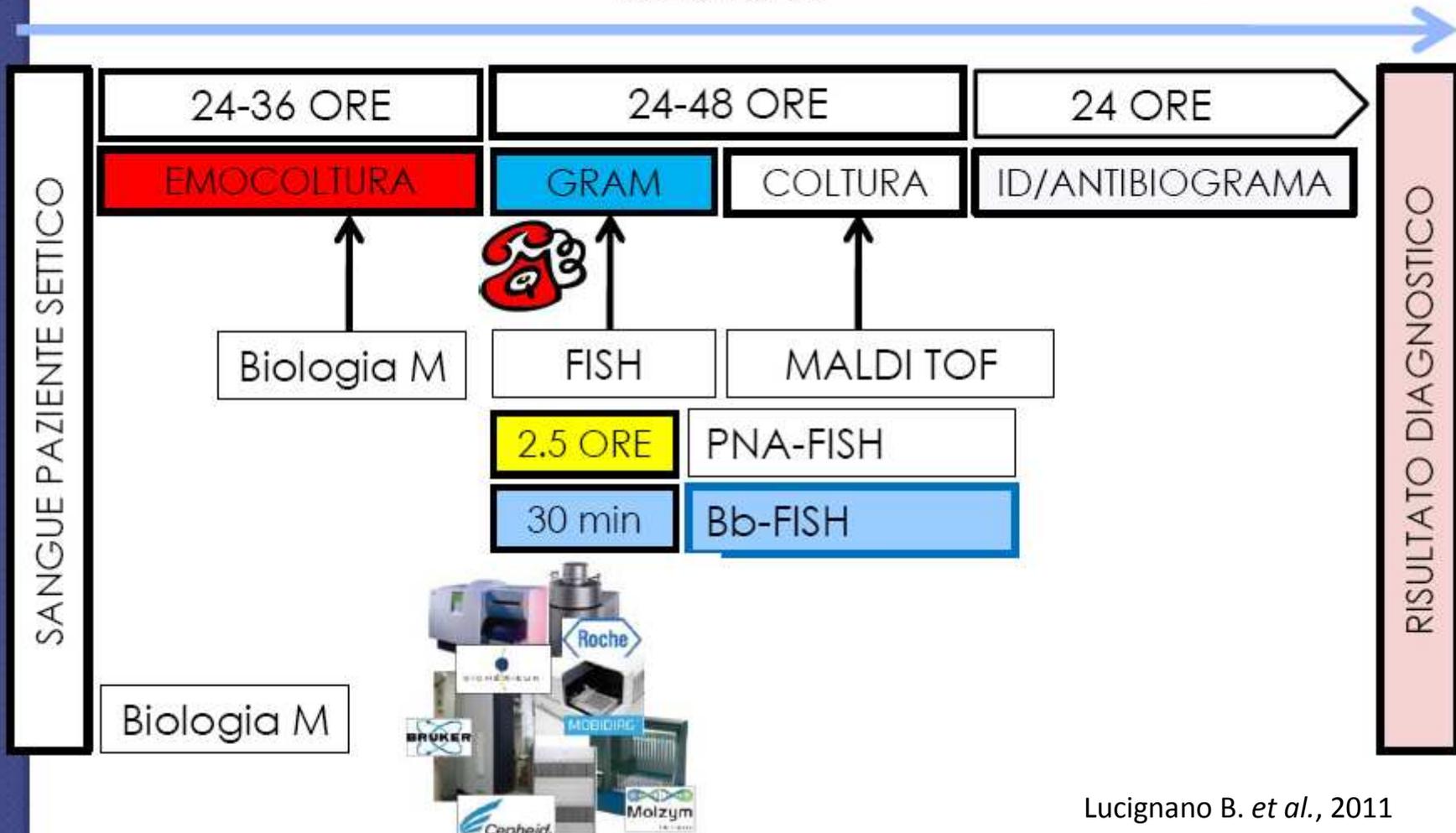


## Il metodo diagnostico di riferimento: l'emocoltura

permette di identificare i microrganismi e di saggiarne la loro suscettibilità agli antibiotici,

presenta il problema della tempestività: il rilevamento della crescita batterica richiede approssimativamente 24-48 ore, o anche di più

**72-96 ORE**

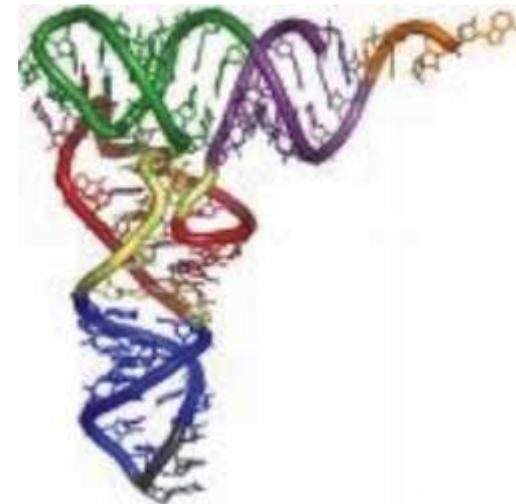
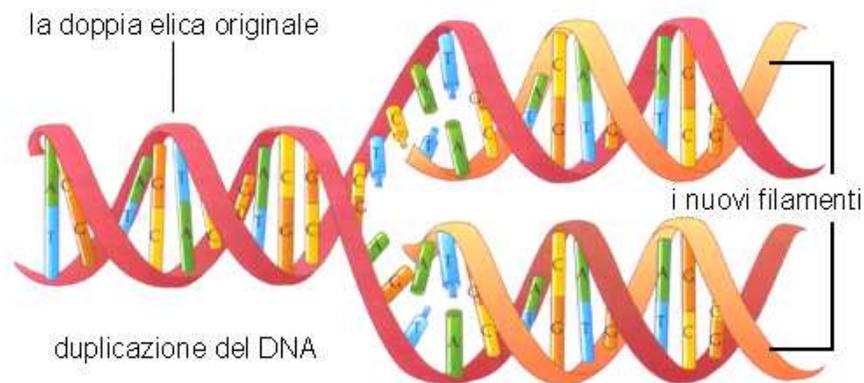


## Tecniche molecolari :

- ➔ per superare i principali limiti del metodo convenzionale
- ➔ per ridurre i tempi di risposta

Le tecniche molecolari attualmente disponibili in commercio :

- basate sul principio di amplificazione del genoma batterico e/o fungino
- basate sul principio dell'ibridazione (ibridazione fluorescente *in situ* (**FISH**) con sonde oligonucleotidiche, in grado di legarsi a sequenze specie specifiche di rRNA batterici e fungini).

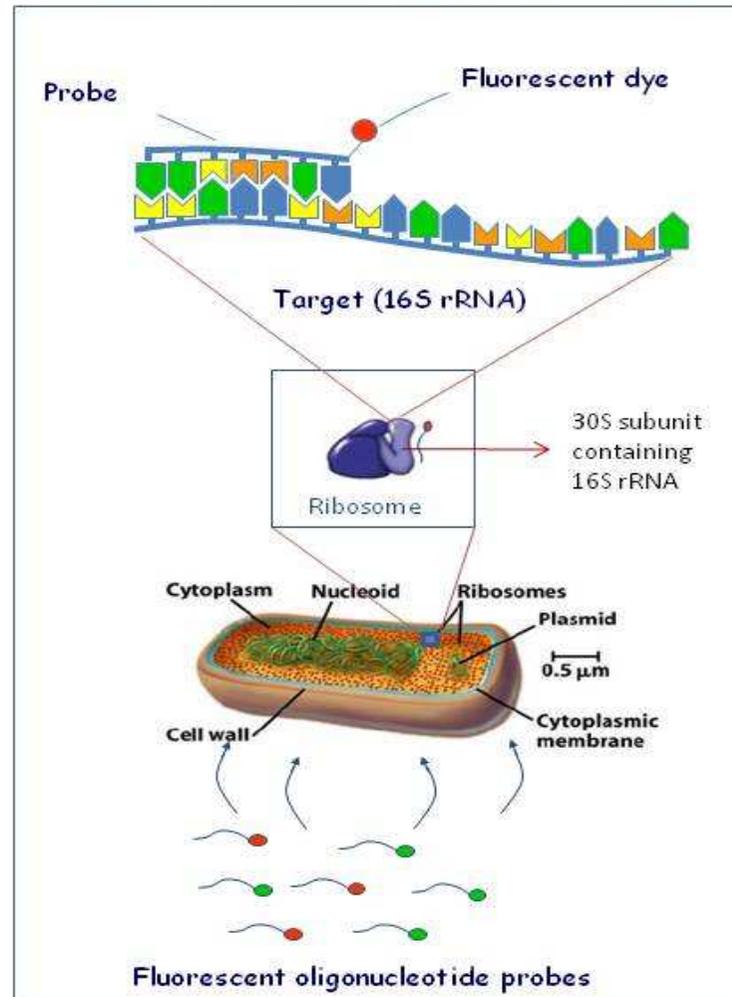


La **“fish”** permette di identificare sequenze specifiche negli acidi nucleici. Tale identificazione avviene mediante sonde marcate, impiegando fluorocromi che emettono fluorescenza a diverse lunghezze d’onda.

La **“fish”**

**Target: RNA ribosomiale**

Ibridazione  
fluorescente  
*in situ*

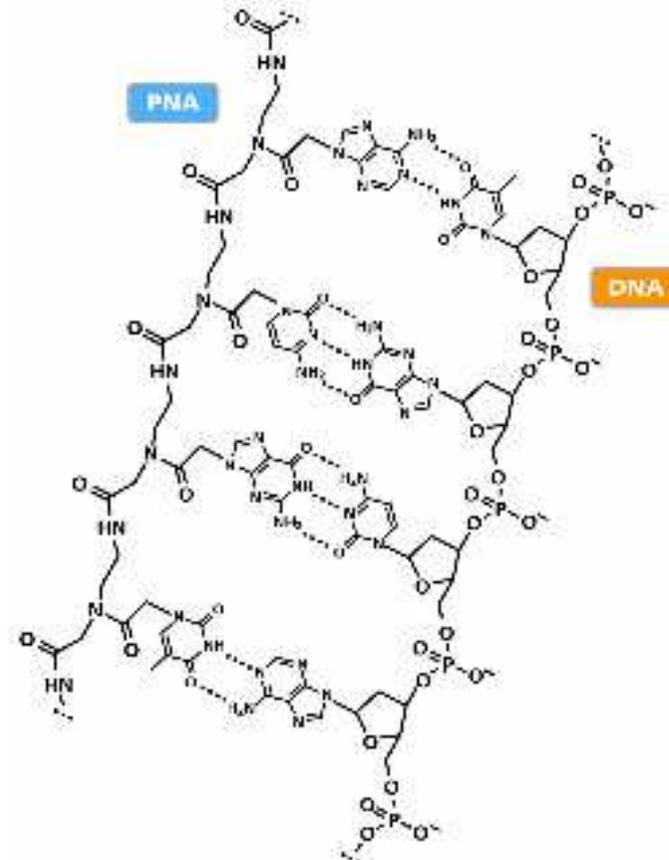


Sonde nucleotidiche  
si legano a sequenze  
specie specifiche di  
rRNA batterici e  
funghi  
(16S, 26S rRNA)

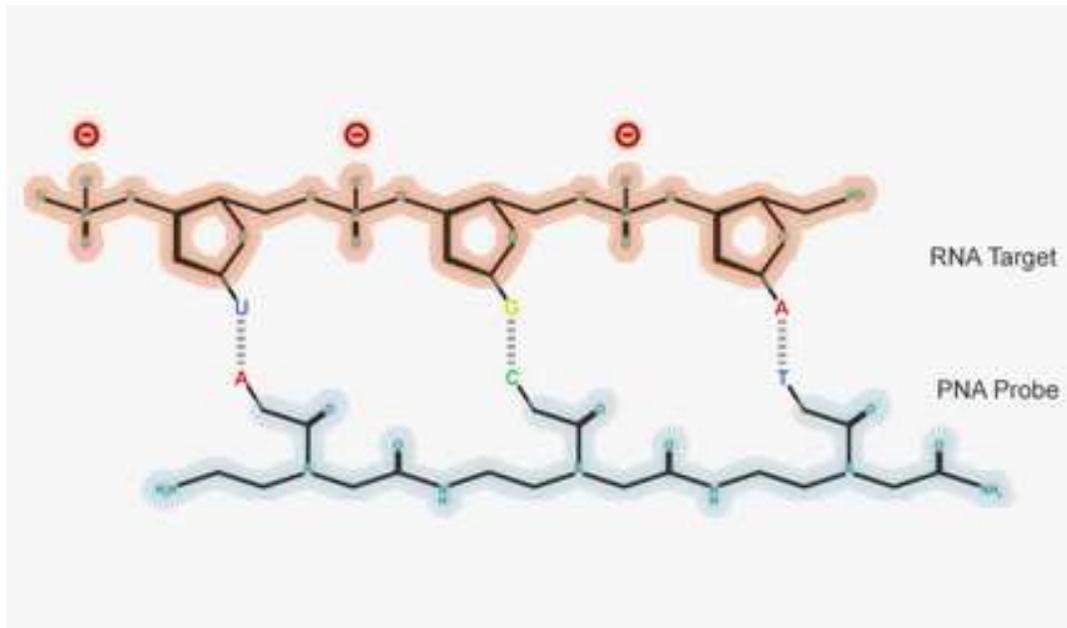
## Sonde molecolari

**Sonde PNA** (*Peptide Nucleic Acid*), oligomeri sintetici che mimano la struttura del DNA o dell'RNA, costituiti da unita ripetute di N-(2 amminoetil)-glicina, a cui sono legate le basi nucleotidiche tramite un legame metilene-carbonile.

Le sonde PNA non contengono gruppi fosfato carichi (minore repulsione elettrostatica), per cui l'ibridazione con il *target* è molto più forte rispetto a quella che si ha con le sonde classiche



## Ibridazione della sonda PNA con RNA target



sensibile, specifica e rapida

identificazione presuntiva  
del patogeno: **3 ore**

Limiti:

esiguo numero di sonde PNA genere- e specie-specifiche disponibili

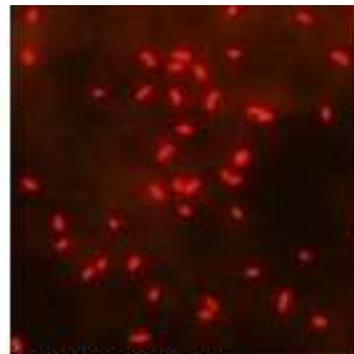
Numerosi lavaggi



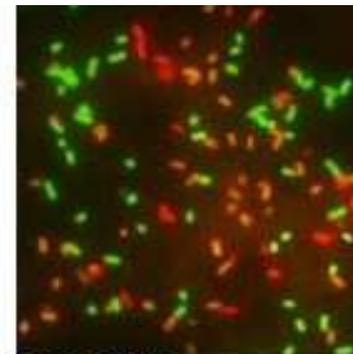
Green fluorescing cells  
(*E. coli*)



Yellow fluorescing cells  
(*K. pneumoniae*)



Red fluorescing cells  
(*P. aeruginosa*)



Mixed Positive

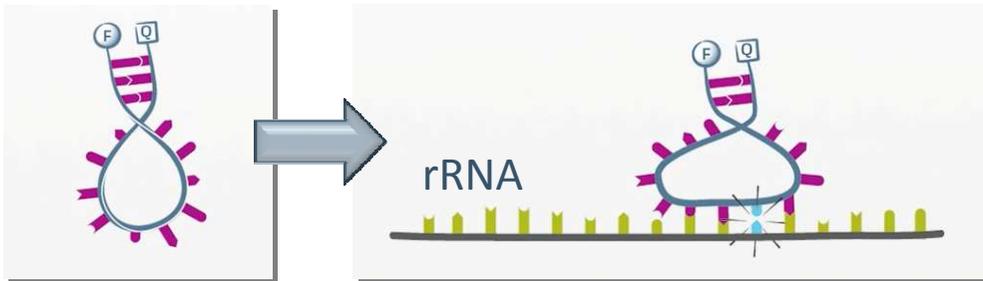
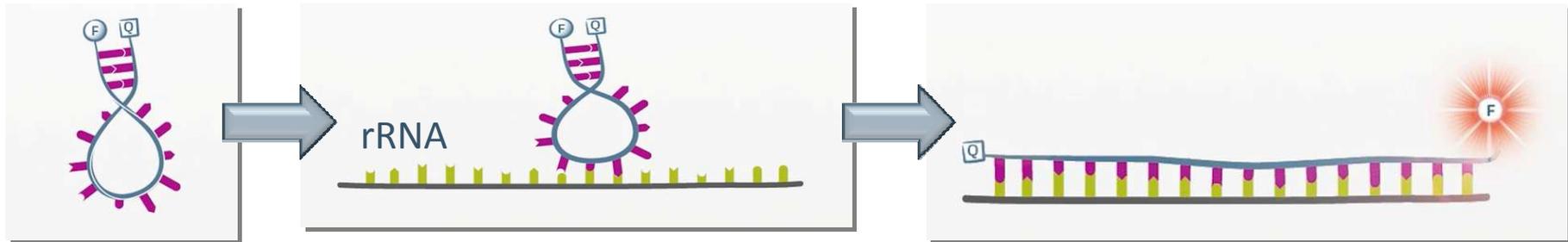
*Dove è la novità???*



**Make Germs Glow**

*„beacon“ closed / hairpin formation*

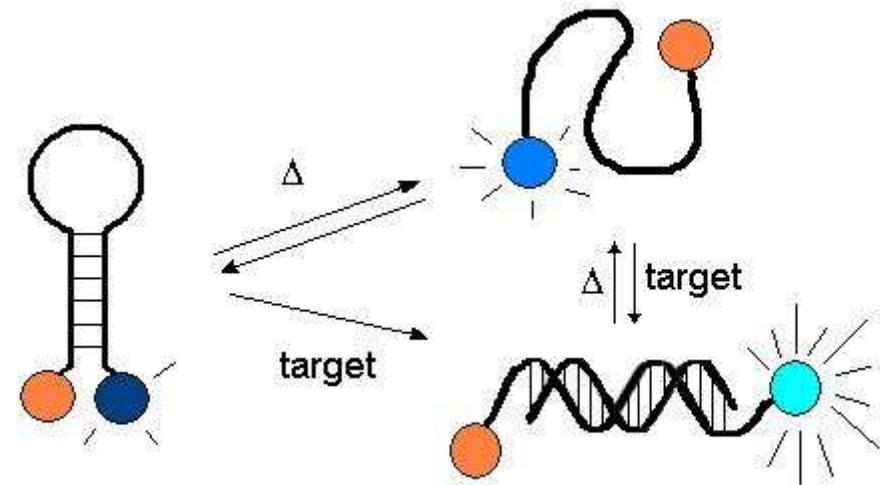
*„beacon“ open formation*



La mancata ibridazione della sonda con il target impedisce l'apertura della forcina e quindi l'emissione di un segnale fluorescente

## Sonde molecolari Beacon Based

Sonde «*Beacons*» identificano regioni conservate di 16S-23S rRNA con una conformazione molecolare che induce la chiusura in assenza del *target*.



Identificazione in **30 minuti** da campione biologico di patogeni di significato clinico

saggio veloce, altamente specifico

**ASSENZA DI LAVAGGI**

**Segnale fluorescente privo di background !!**

In presenza di una emocoltura positiva, è possibile scegliere lo specifico kit di sonda sulla base delle informazioni riguardanti il possibile patogeno, ottenute dalla colorazione di Gram.

*Miacom* utilizza una tecnologia di indagine su cellula intera:

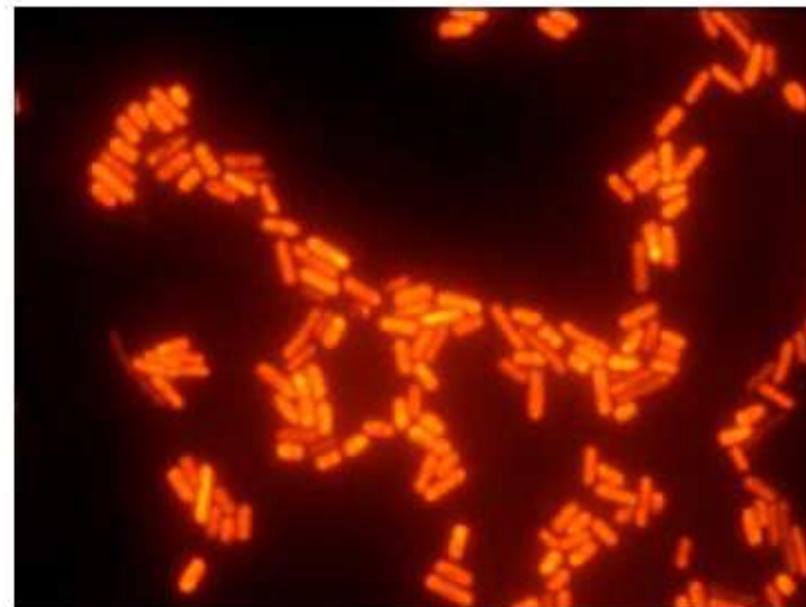
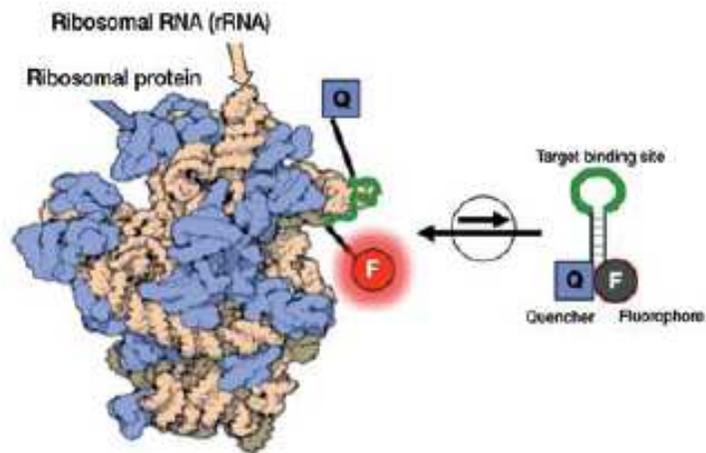
No lisi batterica.

No isolamento materiale genetico.

No amplificazione.

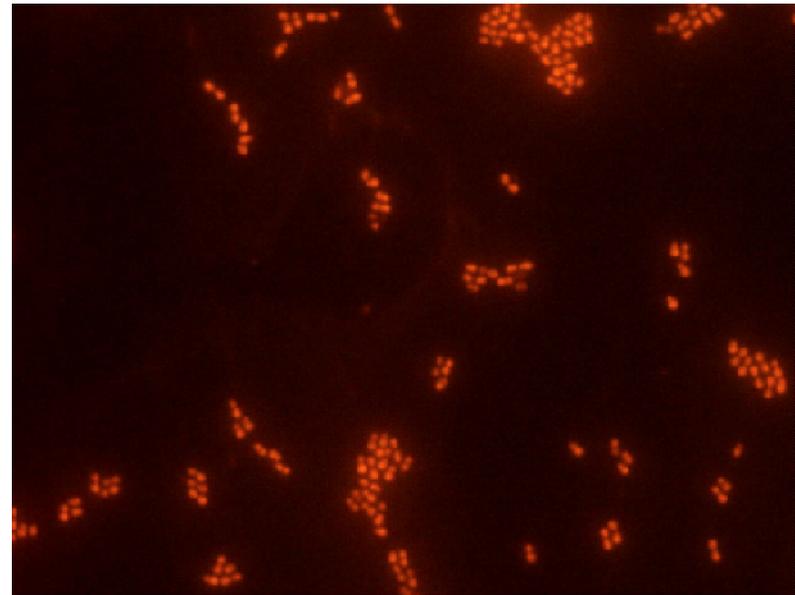
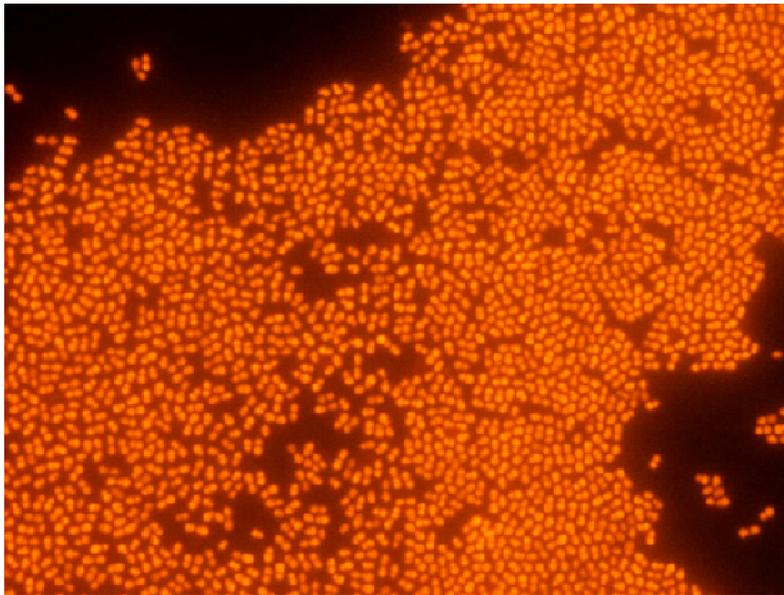
Morfologia intatta della cellula batterica.

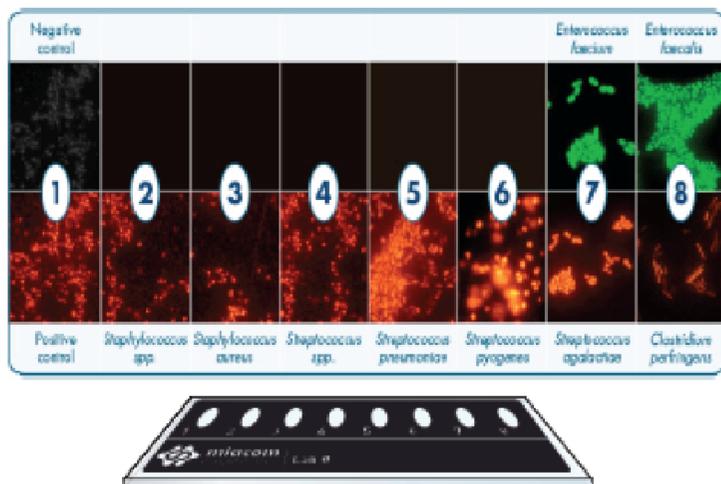
target genetici all'interno di cellule intatte



## Rilevazione della singola cellula e quantificazione

Ogni cellula contribuisce al segnale.  
Indicazione semi-quantitativa della carica batterica totale.





# 1 PAZIENTE = 1 VETRINO

Ciascun **patogeno** è identificato da un campo specifico sul vetrino e da un colore.

## CONTROLLO INTERNO

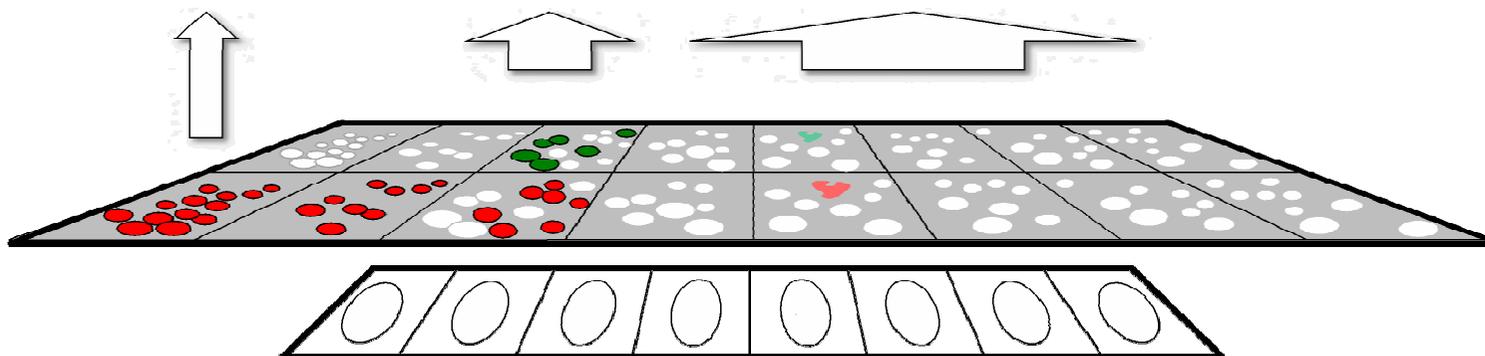
Il segnale nel solo canale rosso dimostra la corretta esecuzione del test e indica la carica totale.

## SEGNALI POSITIVI

Segnali presenti in un solo canale sono veri positivi.

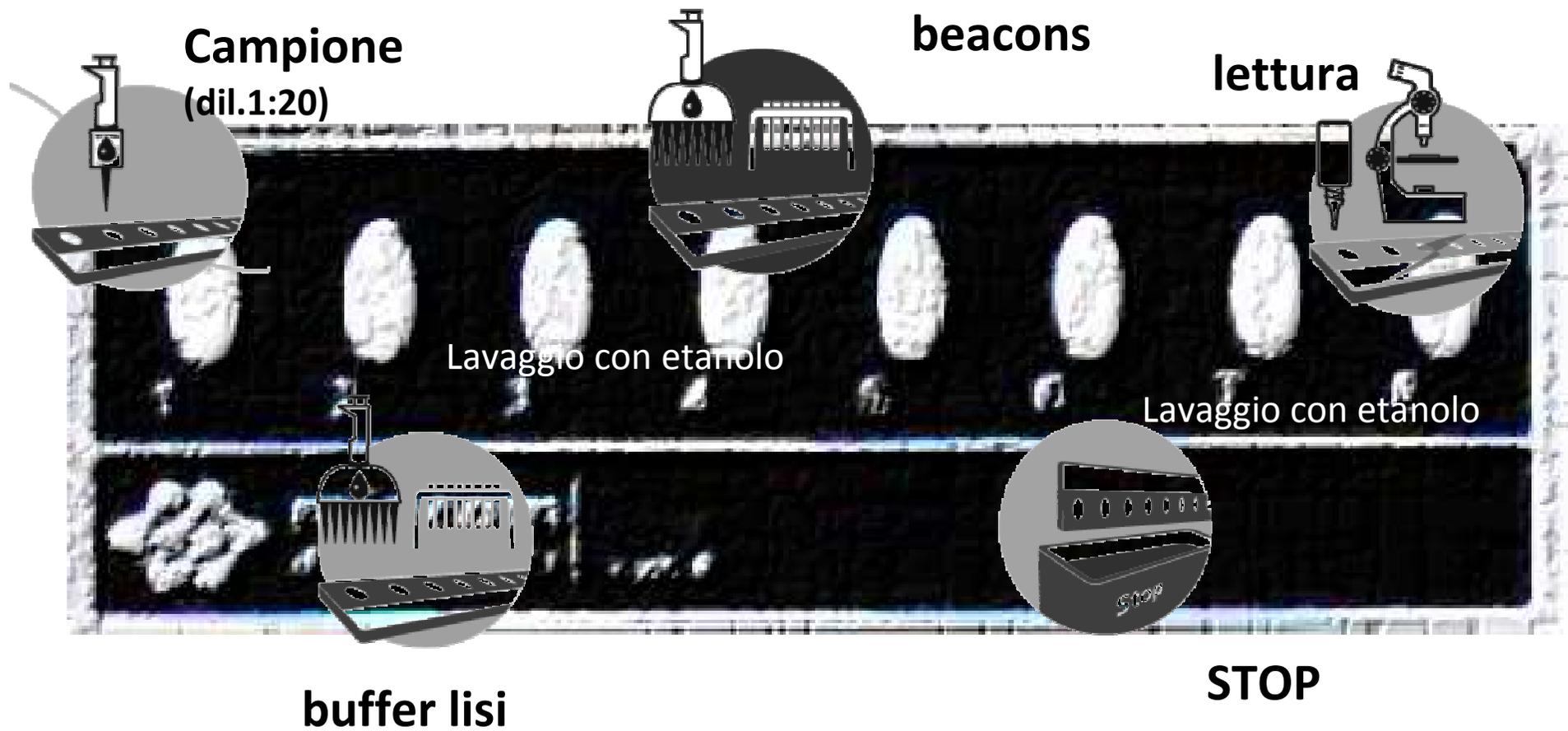
## ASSENZA DEL TARGET E AUTOFLUORESCENZA

L'assenza del segnale in entrambi i canali indica l'assenza del target. Raramente, si può osservare fenomeni di autofluorescenza.

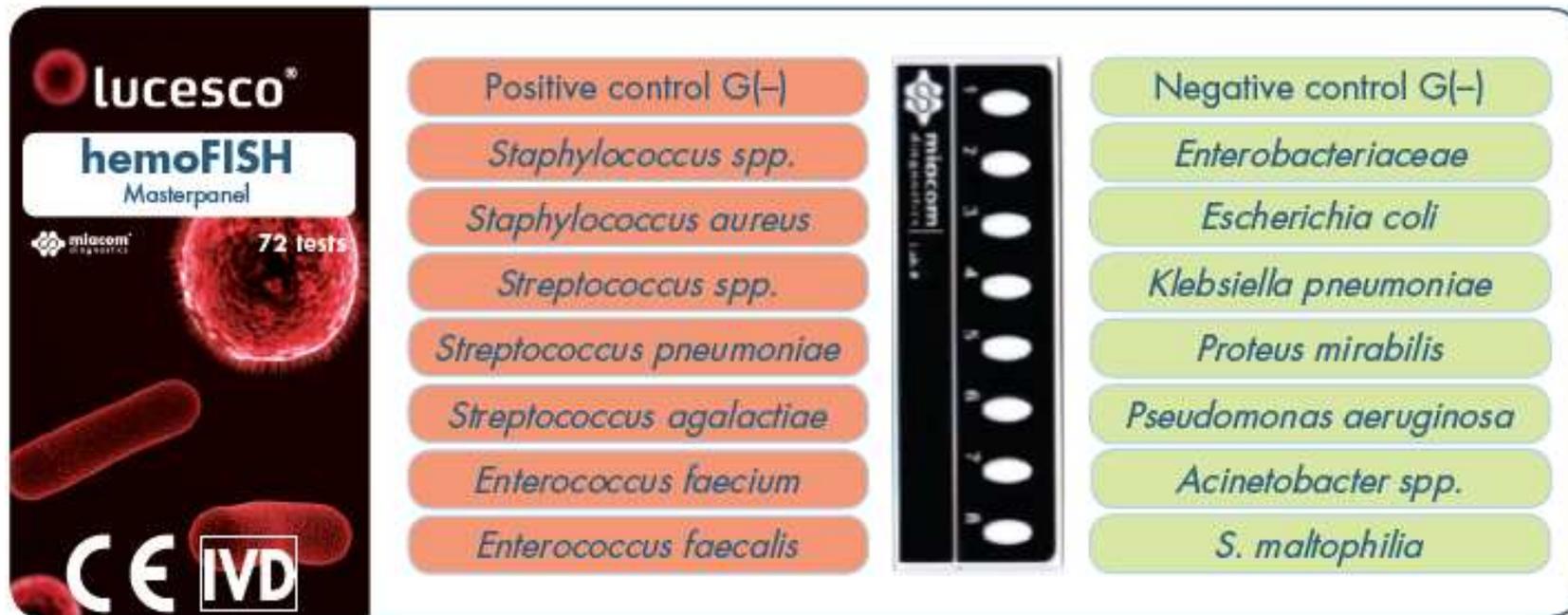


# bbFISH *beacon based Fluorescence In Situ Hybridization*

## PROCEDURA OPERATIVA



Le sonde molecolari sono depositate all'interno di 7 degli 8 campi localizzati su un semplice vetrino da microscopia: ciascun campo contiene la sonda specifica per un determinato target batterico, marcata con entrambi i fluorocromi, in modo tale che ciascun pozzetto effettui parallelamente due identificazioni, una per i patogeni che vengono rilevati con una fluorescenza rossa, l'altra per i patogeni rilevati nel verde.

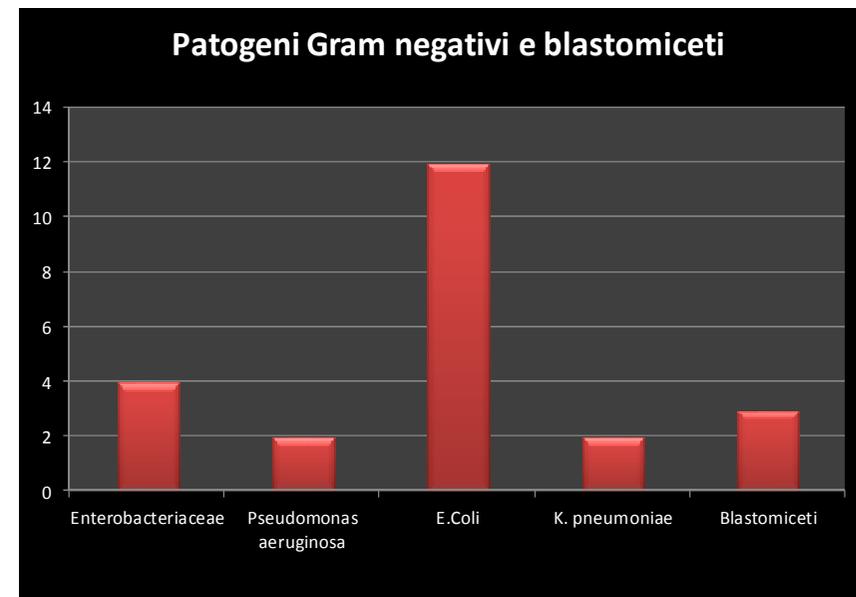
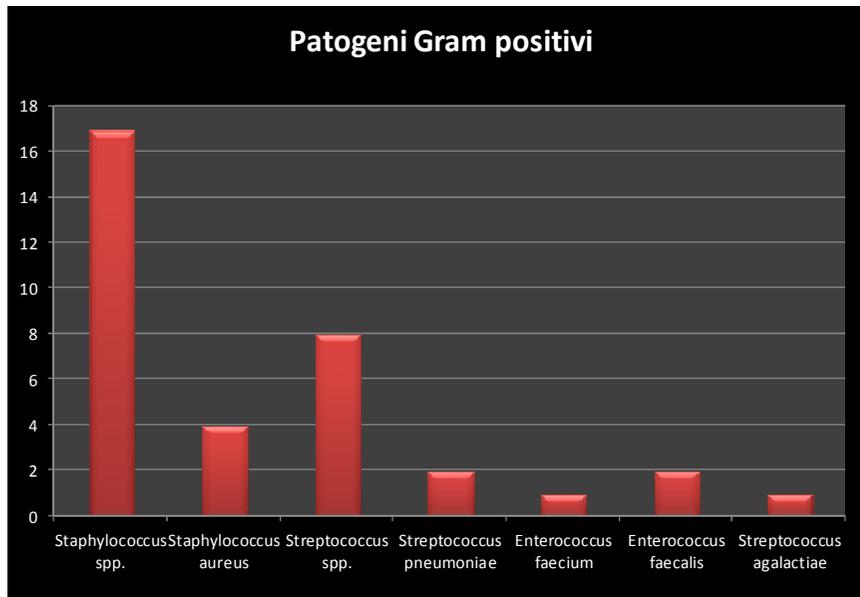


**Nello stesso vetrino è quindi possibile ottenere un'identificazione di 14 patogeni (nel caso di *Masterpanel*, che consentono la rilevazione sia di batteri Gram + che di batteri Gram -).**



## Nostra esperienza Microbiologia e Virologia Ospedale S.Chiara - Trento

Sono state esaminate 62 emocolture positive al batterioscopico Gram, 38 per cocchi Gram positivi, 21 per bacilli Gram negativi, 3 per blastospore. I risultati ottenuti mediante test convenzionale, che prevede l'identificazione a partire da colonia mediante sistema Walkaway (Siemens), sono stati confrontati con il test bb-FISH



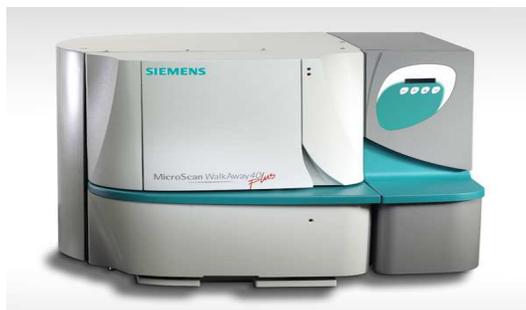
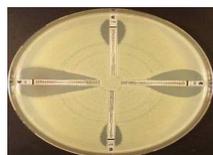
Esito metodo tradizionali	Esito bb-fish	Numero campioni
G+	G+	
<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	5
<i>Streptococcus spp (solo genere, senza id specie).</i>	<i>Streptococcus spp (solo genere, senza id specie).</i>	9
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	1
G-	G-	
<i>Enterobacteriaceae (solo genere, senza id specie)</i>	<i>Enterobacteriaceae (solo genere, senza id specie)</i>	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>E.Coli</i>	<i>E.Coli</i>	12
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	2
<i>Blastomiceti</i>	<i>Blastomiceti</i>	3
<i>Bastoncelli g- non fermentanti</i>	<i>Niente (forse carica batterica troppo bassa o falso evento di sepsi)</i>	1 (bastoncelli g- non fermentanti)
<i>Listeria monocitogenes</i>	<i>Niente perché nel pannello non c'è patogeno presente nel campione (ma C+ positivo)</i>	1 (Listeria)

## Risultati

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

In 2 casi il master-panel non ha rilevato alcun risultato:

- in uno perché il patogeno responsabile della sepsi era una *Listeria*, non presente nel pannello.
- 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



**Questa tecnologia è caratterizzata da: elevata sensibilità e specificità e una fluorescenza di facile lettura, la rende applicabile a tutte le realtà di laboratorio.**

## Caratteristiche peculiari del test

- ✓ Test molecolare affidabile: alta sensibilità e specificità.
- ✓ Risultato veloce e direttamente da campione diretto.
- ✓ Target genetici multipli: fino a 14 ID.
- ✓ ID di target genetici all'interno di cellule intatte.
- ✓ Rilevazione della singola cellula e quantificazione.
- ✓ Hardware richiesto minimale.
- ✓ Si adatta alla routine di laboratorio.
- ✓ Minimo «expertise» dell'Operatore.
- ✓ Fino a 10 campioni batch.

## Trattamenti terapeutici mirati con importanti ricadute sulla prognosi del paziente

