

Biggest in the little:  
GeneXpert, the perfect size for every test,  
fast, easy and accurate

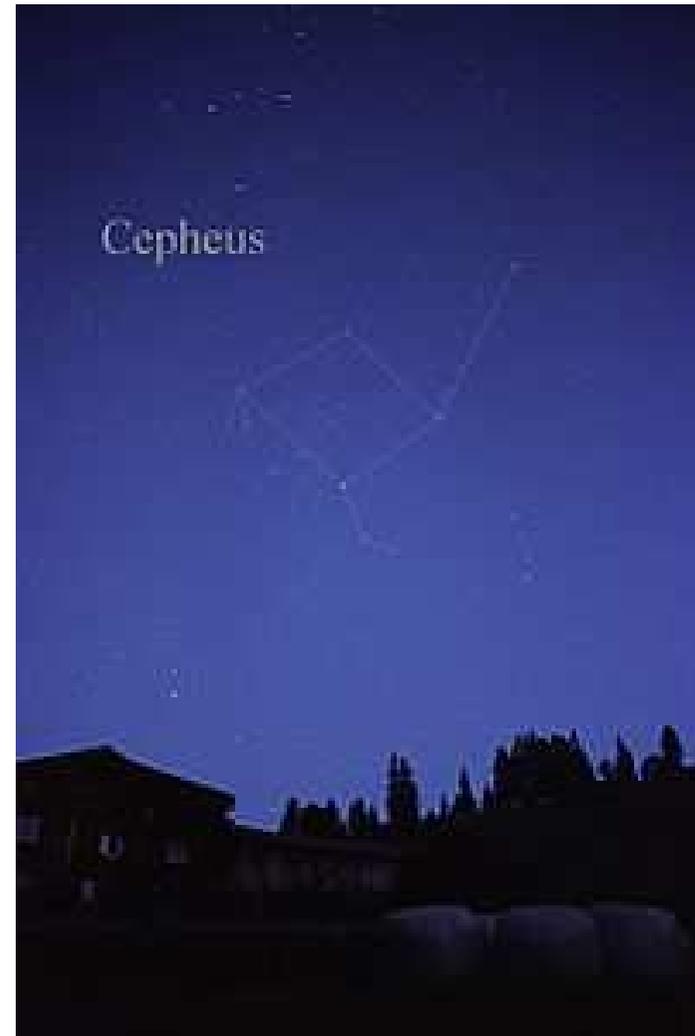
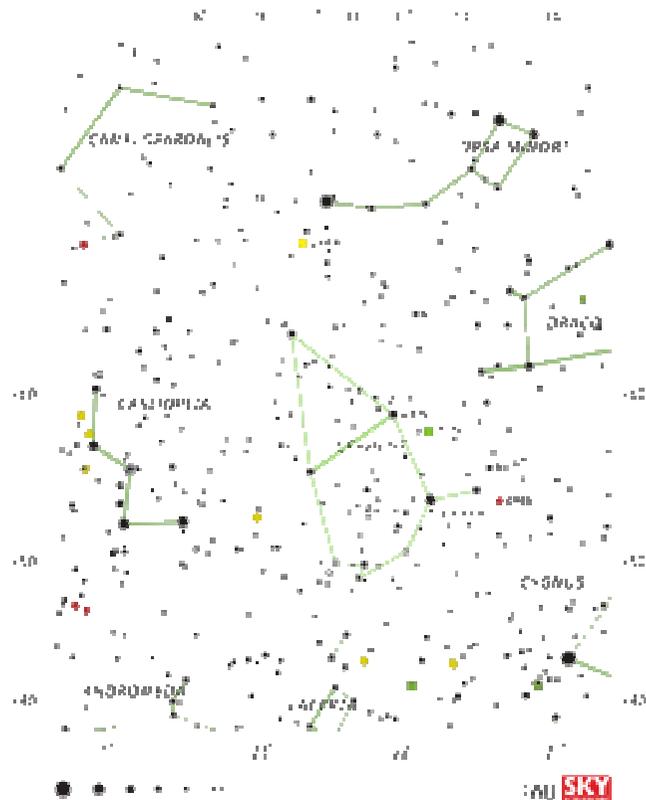


Dott.ssa Lucia Collini – 3° Congresso NewMicro



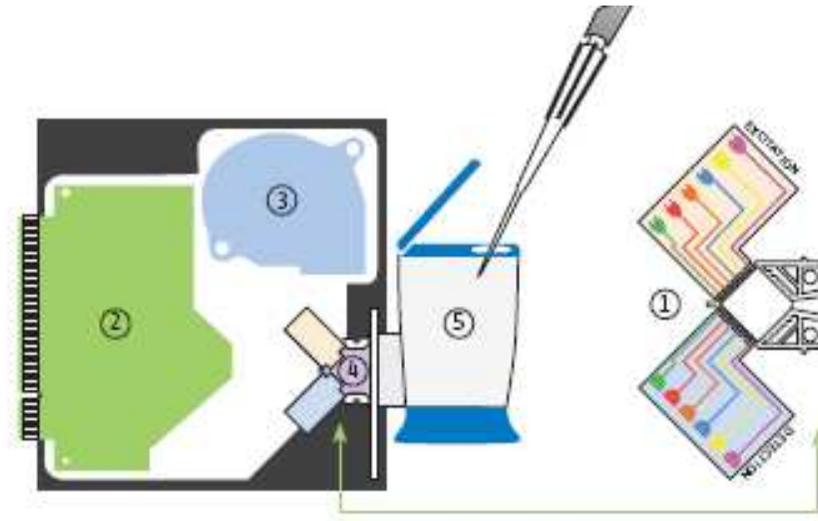
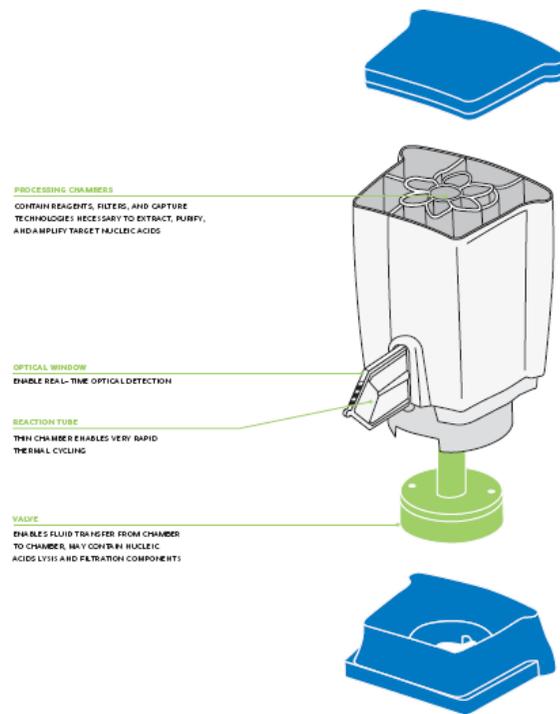
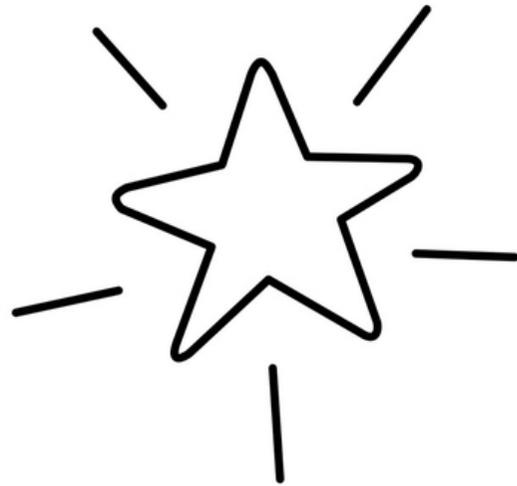
Cepheid è un membro di una classe di stelle molto luminose.

Cepheus è una costellazione nel cielo del nord.



Stella: Corpo celeste dotato di luce propria

LAB on a Chip Platforms



Stella: simboleggia la categoria di alberghi

11 camere di reazione, ciascuna controllata in maniera indipendente

## Tecnologia GeneXpert: *Real Time PCR* in Microfluidica La miniaturizzazione della PCR

Alla base di chip miniaturizzati per PCR ci sono i *sistemi micro-elettromeccanici (MEMS)*

Integrazione di più moduli di elaborazione che riduce il consumo di potenza e permette un notevole risparmio in termini di tempo, (volumi di reazione più piccoli e quindi elevati rapporti superficie-volume che facilitano il trasferimento di energia termica)



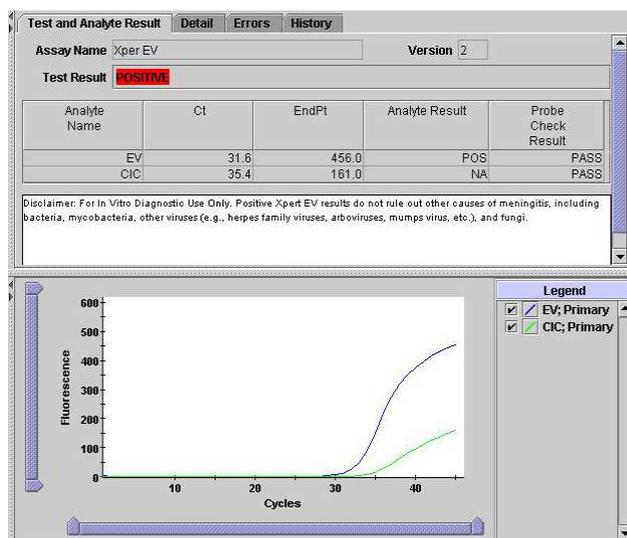
Contaminazioni Minimizzate: la manipolazione del campione viene notevolmente ridotta e limitata alla preparazione dello stesso

Il processo analitico consiste nelle seguenti fasi, tutte svolte automaticamente dallo strumento:

Purificazione del campione;

Amplificazione degli acidi nucleici contenuti utilizzando real-time PCR;

Rilevamento delle sequenze bersaglio tramite l'emissione di un segnale a fluorescenza.



Amplificazione e rilevazione del *target* avvengono contemporaneamente

Il test é supportato dal sistema GeneXpert Dx, che automatizza il processo.



*Xpert Enterovirus*  
*Xpert H1N1*  
*Xpert Clostridium difficile*  
*Xpert MRSA from blood culture*  
*Xpert MTB*



La nostra esperienza con la tecnologia GeneXpert  
Microbiologia e Virologia Ospedale di Trento

## Real Time PCR nella diagnosi delle infezioni del sistema nervoso centrale

Gli enterovirus vengono considerati la più comune causa di meningite indipendentemente dall'età dei pazienti,

La meningite da enterovirus può essere accompagnata da manifestazioni mucocutanee tra cui presenza di vescicole localizzate, che si osservano nelle patologie di mani, piedi e bocca, e nella maggior parte dei casi è autolimitante e comporta una prognosi benigna,

Il termine enterovirus fa riferimento alla modalità di trasmissione dell'infezione, nella maggior parte dei casi asintomatica. Tuttavia, possono causare infezioni sistemiche e presentano una propensione verso la neuroinvasività. Il virus si può ritrovare nelle basse ed alte vie respiratorie e nelle feci, oltre che nel liquido cefalo-rachidiano.



Le infezioni da enterovirus sono comuni a tutto il pianeta.

Non sono frequentemente diagnosticate, solo negli U.S.A. ogni anno 10-15 milioni di infezioni sintomatiche.

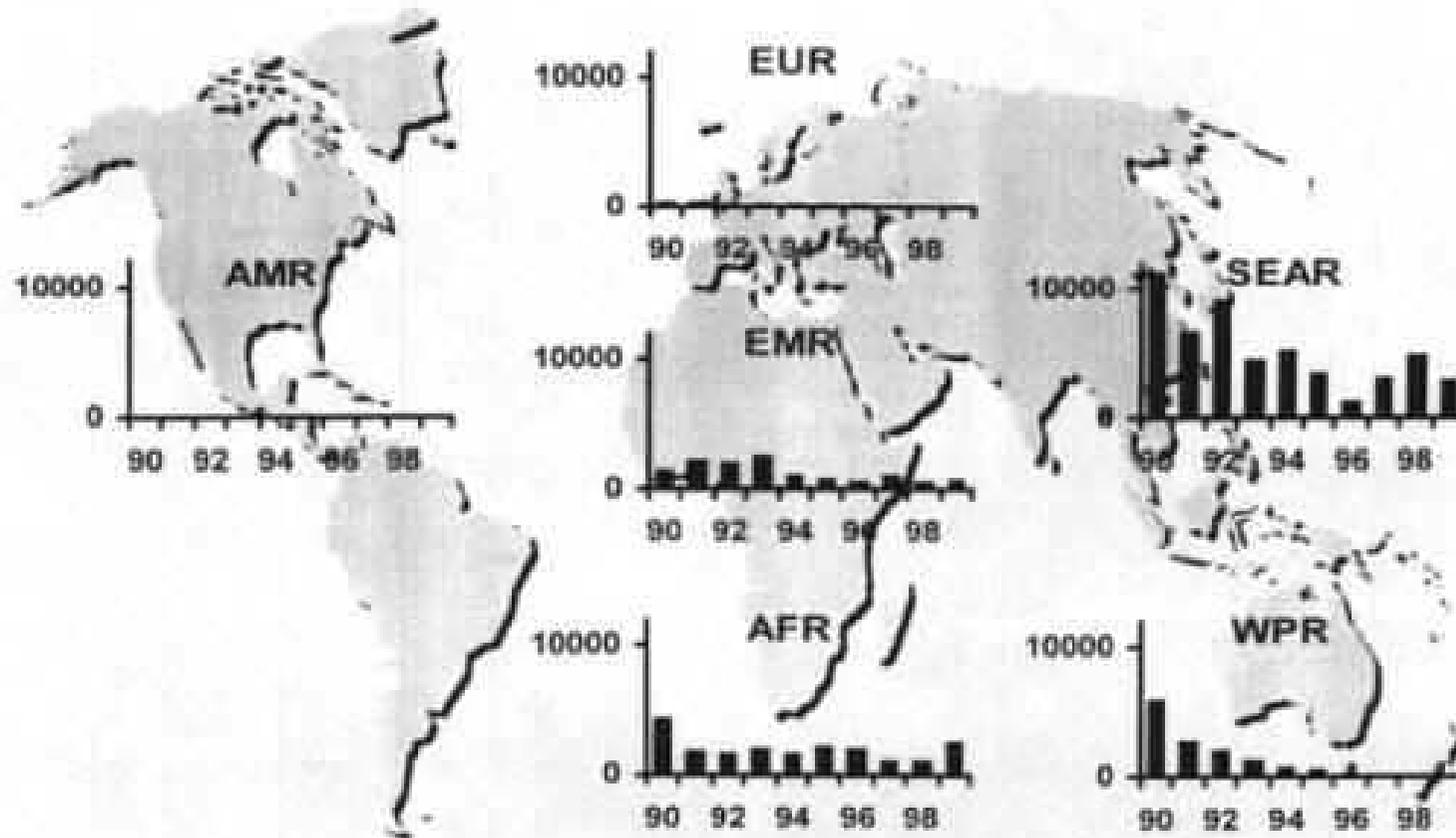
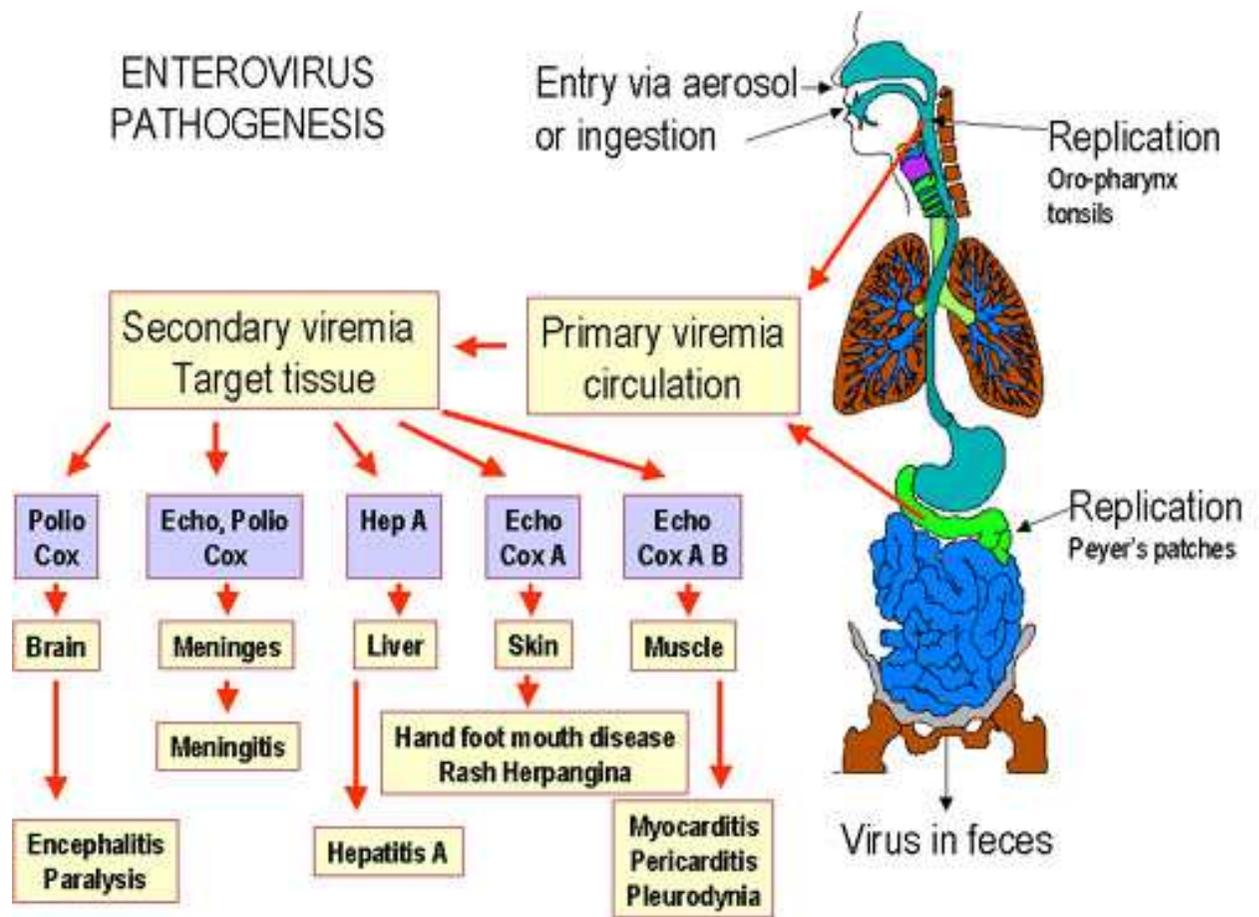
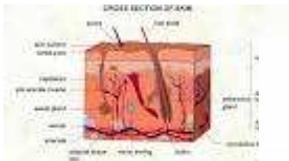
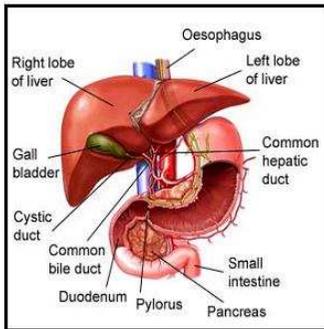
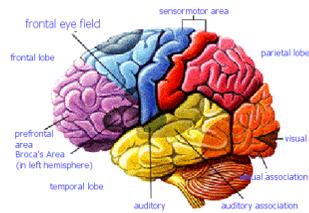


FIGURE 6 Global annual polio cases reported by the WHO from 1990 to 1999. The map shows the number of polio cases per year for each WHO region (AFR, African region; AMR, American region; EMR, eastern Mediterranean region; EUR, European region; SEAR, southeast Asian region; WPR, western Pacific region). For reference, see "Geography, Season, Socioeconomy, Sex, Age, and Risk Factors," in the text.

Il virus polio è ancora endemico

I siti primari di infezione sono il tessuto linfoide ed epiteliale del faringe e dell'intestino. La produzione di virus porta ad una viremia transitoria (primaria) che permette loro di raggiungere gli organi-bersaglio (soprattutto il sistema nervoso centrale e periferico, miocardio, pelle, fegato e muscoli).

## La meningite da Enterovirus



# GeneXpert RT-PCR nella diagnosi delle infezioni del sistema nervoso centrale

## Caso clinico 1

Notte di Natale – 24/12/2012 :

Uomo di 50 anni viene portato in ospedale in stato soporoso,

-confusione mentale,

-dissociato nel tempo e nello spazio

Inizialmente medico di P.S. sospetta un coma etilico,  
consulenza neurologica suggerisce una rachicentesi

Anamnesi riferita dalla moglie:

-Bimbi a casa dall'asilo per diarrea

-Nota ipogammaglobulinemia



# GeneXpert RT-PCR nella diagnosi delle infezioni del sistema nervoso centrale

## Caso clinico 2

15 Agosto 2011:

M.Z., ragazzino di 15 anni, entra in Pronto Soccorso

-febbre

-cefalea intensa,

-rigor nuchalis,

-lieve rash cutaneo sul torace

Anamnesi:

-vacanza in campeggio,

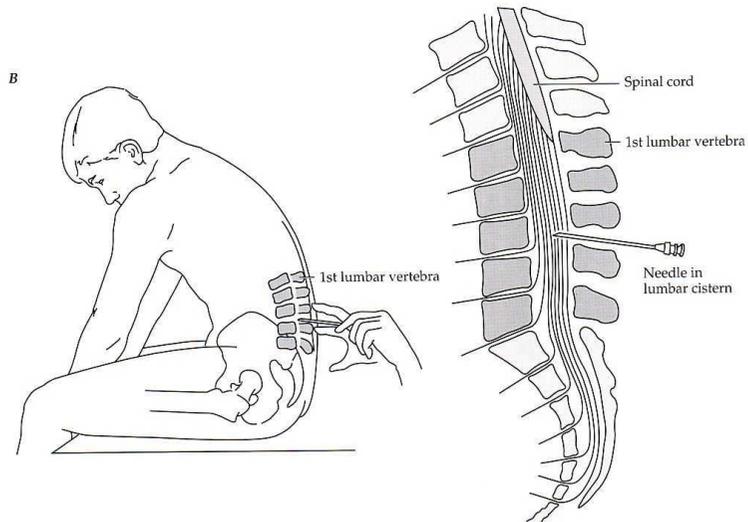
-terapia con cefalosporina da 48 ore

Infettivologo sospetta una meningite  
e suggerisce una puntura lombare



## Indagini di laboratorio

In entrambi i casi : Rachicentesi



### Caso clinico 1

#### Liquido cerebrospinale:

- ✓ sublimpido
- ✓ Proteine: 65 mg/dl
- ✓ Glucosio: 90 mg/dl
- ✓ Conta leucocitaria:  
300 elementi (75% linfociti 25% neutrofili)



### Caso clinico 2

#### Liquido cerebrospinale:

- ✓ torbido
- ✓ Proteine: 50 mg/dl
- ✓ Glucosio: 45 mg/dl
- ✓ Conta leucocitaria:  
2500 elementi (65% neutrofili  
25% linfociti)

## Caso clinico 1

Vetrino Gram: negativo

Antigeni: non eseguiti, Coltura: risultato disponibile dopo 18-24h

Apprensione dei familiari

## Caso clinico 2

Vetrino Gram: negativo

Antigeni: negativi, Coltura: negativa

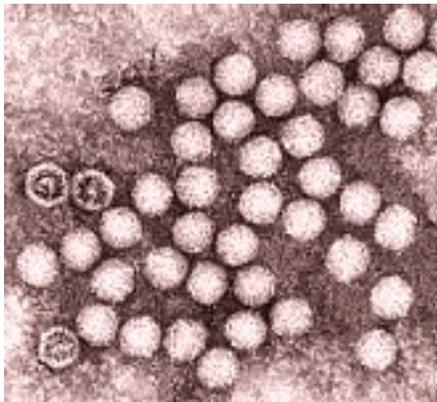
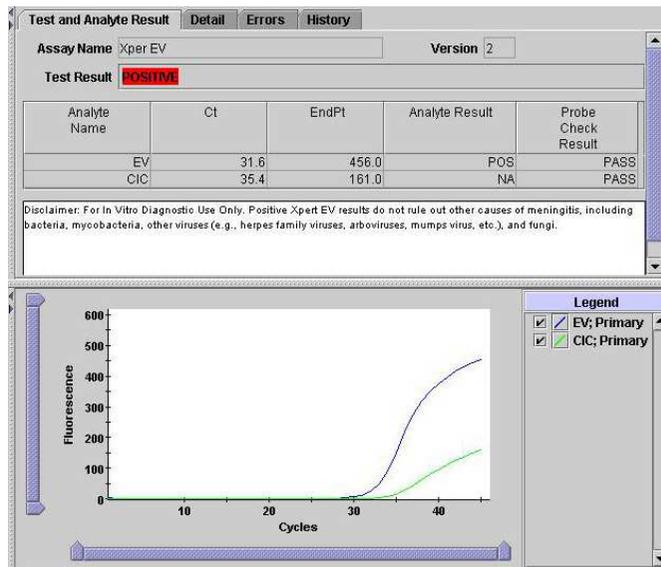
Biologia molecolare per batteri: negativa

Profilassi sì/profilassi no?

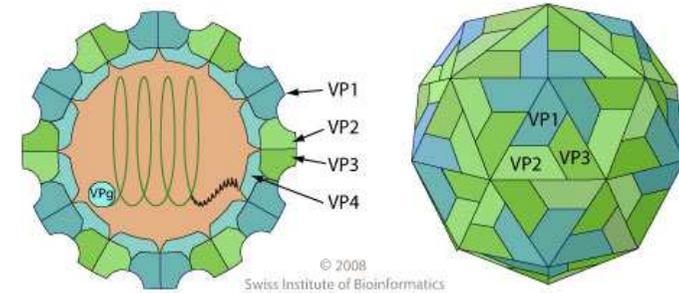


**Urgenza di fare diagnosi**

# Biologia molecolare: **POSITIVA** *Enterovirus*



IgM - CoxsackieVirusA POSITIVA

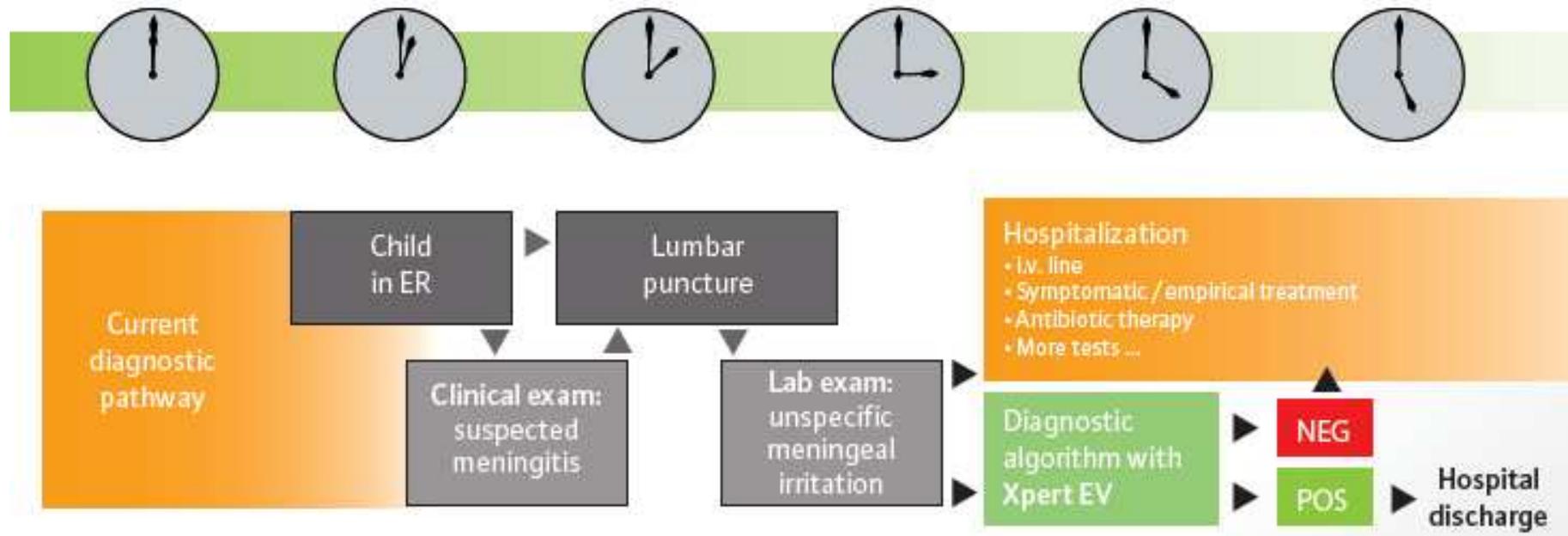


Species	Serotypes
A	Coxsackie A2-A8, A10, A12, A14, A16, EV71
B	Coxsackie A9, B1-B6, Echo 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33, EV69
C	Coxsackie A11, A13, A15, A17-22, A24
D	EV68, EV70
Poliovirus	Poliovirus 1-3

Risultati in ~2 ore

Una risposta tempestiva cambia il percorso del paziente

Una diagnosi rapida si riflette su una corretta gestione del paziente



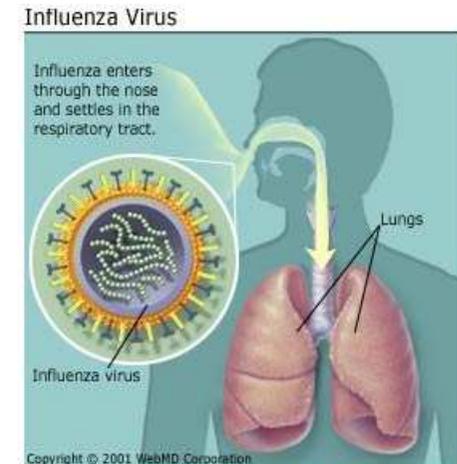
Impatto diagnostico :  
Identificare i pazienti con  
*Enterovirus* aiuta ad escludere  
una meningite batterica



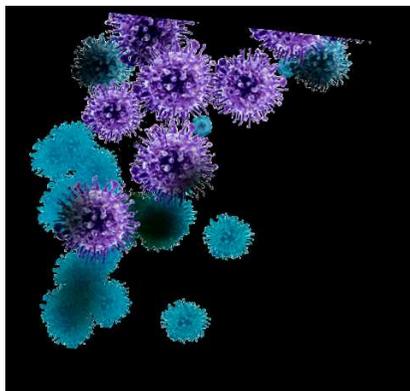
Nessun specifico trattamento  
antivirale è attualmente disponibile,  
terapia sostitutiva con  
immunoglobuline può essere utile nei  
pazienti con ipogammaglobulinemia

## La nostra esperienza con la diagnosi rapida di influenza

La maggior parte dei campioni pervenuti alla nostra Unità Operativa nel periodo da novembre 2012 a marzo 2013 con richiesta di ricerca virus influenza provenivano dal Pronto Soccorso, dalla Unità di terapia intensiva e dalla Pneumologia.



La maggior parte dei pazienti con malattia clinica compatibile con influenza non complicata, che non hanno avuto accesso in ospedale e che risiedono in una zona in cui i virus influenzali sono in circolazione (picco epidemico) non hanno avuto il test diagnostico molecolare.



## *S.O.S. H1N1*

I pazienti che abbiamo sottoposto al test diagnostico comprendono:

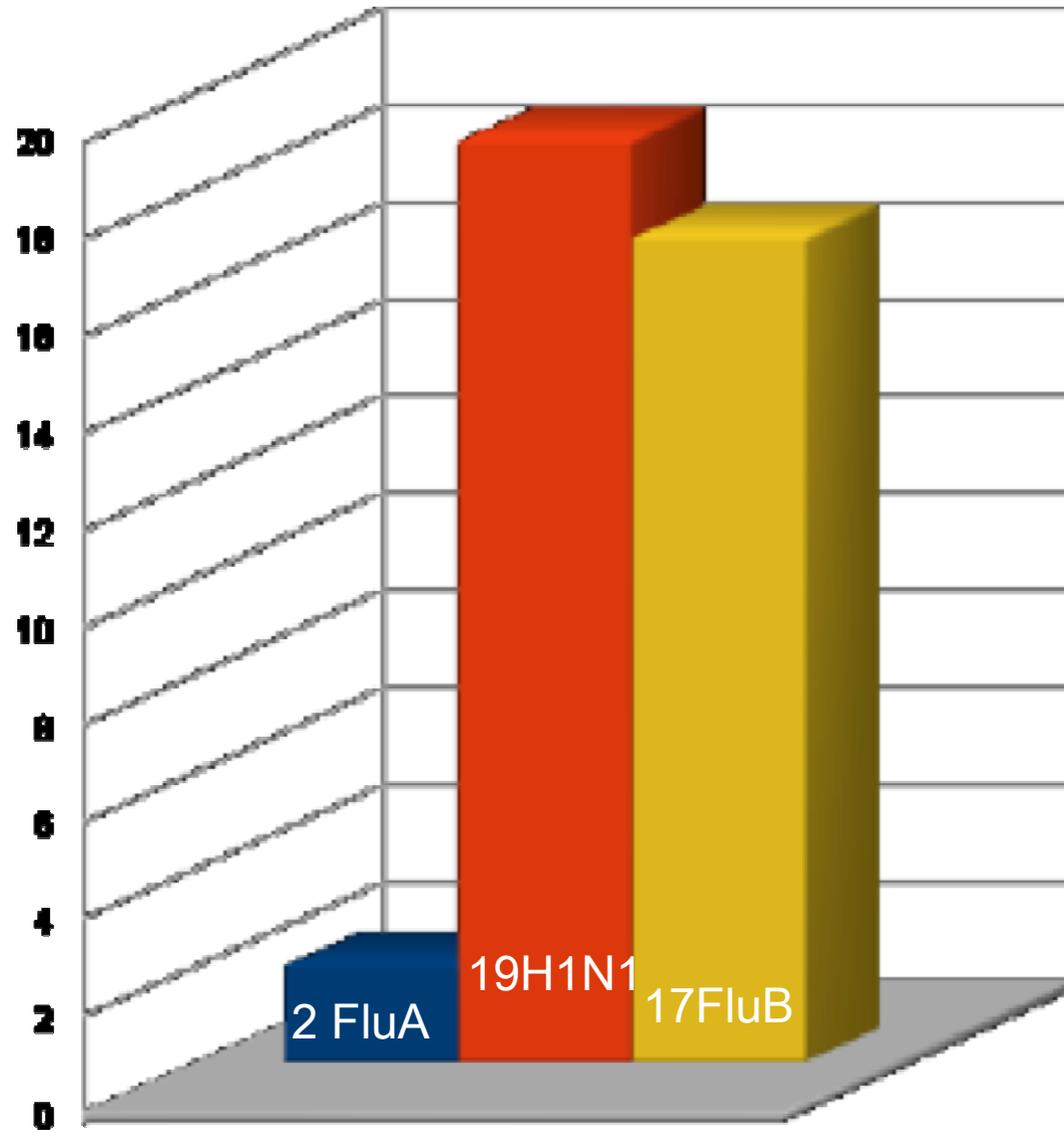
- i malati ospedalizzati,
- quelli per i quali una diagnosi di influenza può modificare le decisioni riguardanti le cure mediche, far sì che si attuino programmi di controllo della diffusione del virus e di gestione dei contatti.

I casi più rappresentati sono stati i casi gravi, in insufficienza respiratoria ed in ventilazione assistita.

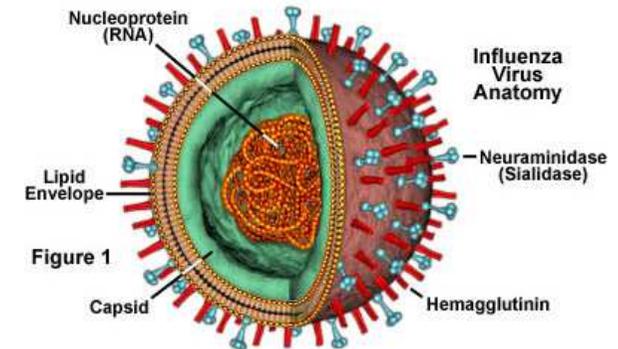
La conferma di un nuovo caso di infezione di influenza A (variante H1N1) non è stato eseguito a scopo di sorveglianza epidemiologica, ma oltre in pazienti con sintomatologia clinica severa, in donne in gravidanza o in allattamento e in soggetti immunocompromessi.



# La nostra esperienza con la diagnosi rapida di influenza



1 novembre 2012 al 1 marzo 2013



- Flu A
- 2009 Flu A H1N1
- Flu B



## Case Definition

A confirmed case of influenza A (H1N1) virus infection is defined as a person with an influenza-like illness with laboratory confirmed novel influenza A (H1N1) virus infection by one or more of the following tests:

- real-time RT-PCR
- viral culture



## Recommended tests

Real-time RT-PCR is the recommended test for confirmation of novel influenza A (H1N1) cases.

<u>Comparison of Available Influenza Diagnostic Tests</u>					
<b>Influenza Diagnostic Tests</b>	<b>Method</b>	<b>Availability</b>	<b>Typical Processing Time</b>	<b>Sensitivity for 2009 H1N1 influenza</b>	<b>Distinguishes 2009 H1N1 influenza from other influenza A viruses?</b>
Rapid influenza diagnostic tests (RIDT)	Antigen detection	Wide	0.5 hour	10 - 70%	No
Direct and indirect immunofluorescence assays (DFA and IFA)	Antigen detection	Wide	2 - 4 hours	47-93%	No
Viral isolation in tissue cell culture	Virus isolation	Limited	2 -10 days	-	Yes
Nucleic acid amplification tests (including rRT-PCR)	RNA detection	Limited	48 - 96 hours [6-8 hours to perform test]	86 - 100%	Yes

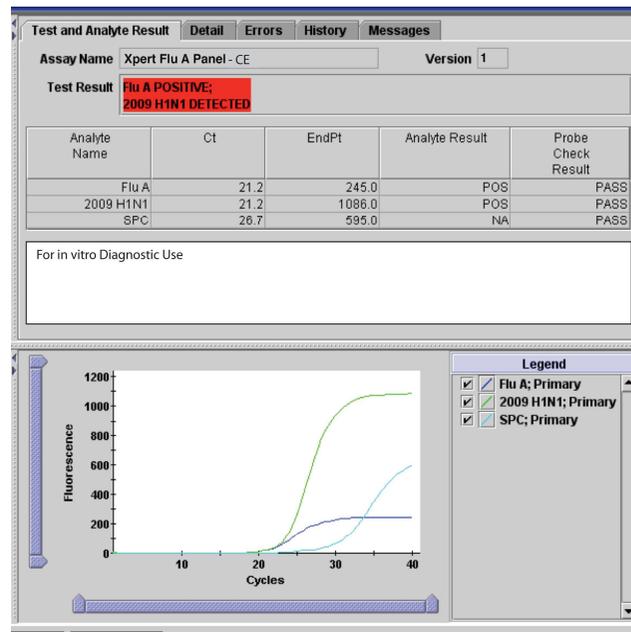
I saggi di laboratorio per la ricerca di virus influenzale sono numerosi, tuttavia i metodi disponibili hanno una bassa sensibilità e specificità, e non permettono la distinzione nella variante influenza A H1N1.

Il saggio molecolare GeneXpert Cepheid, attraverso una PCR Real Time di facile utilizzo, che prevede l'amplificazione di un controllo interno, consente in 75 minuti di dare la risposta !

La semplicità di allestimento del saggio e la velocità di risposta ci ha permesso di utilizzarlo 7 giorni su 7, anche in regime di urgenza.

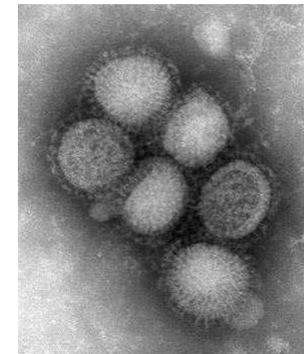


**TOTAL HANDS-ON  
TIME <2 MINUTES  
Results in 75 minutes**



RESULTS INDICATING:

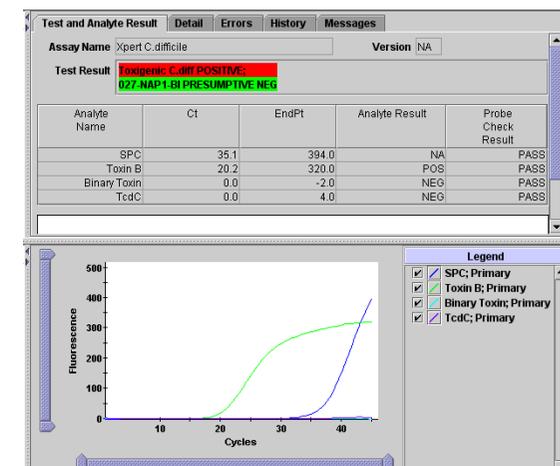
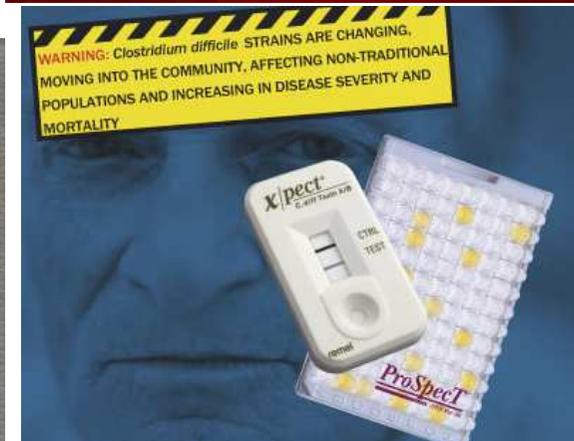
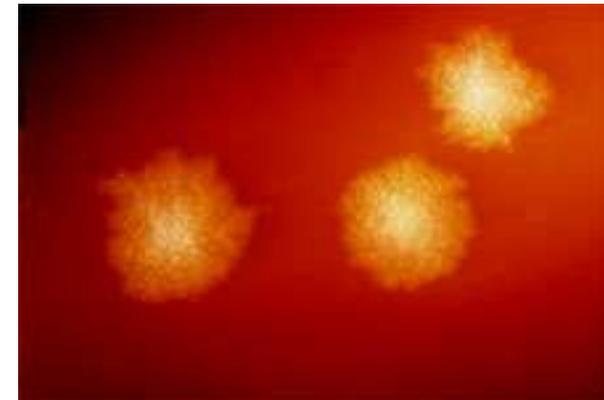
- Flu A
- Flu B
- Flu A 2009 H1N1
- Negative



# *Clostridium difficile*

Un semplice esame di laboratorio non è sufficiente a porre (o ad escludere) diagnosi di infezione da *C.difficile*

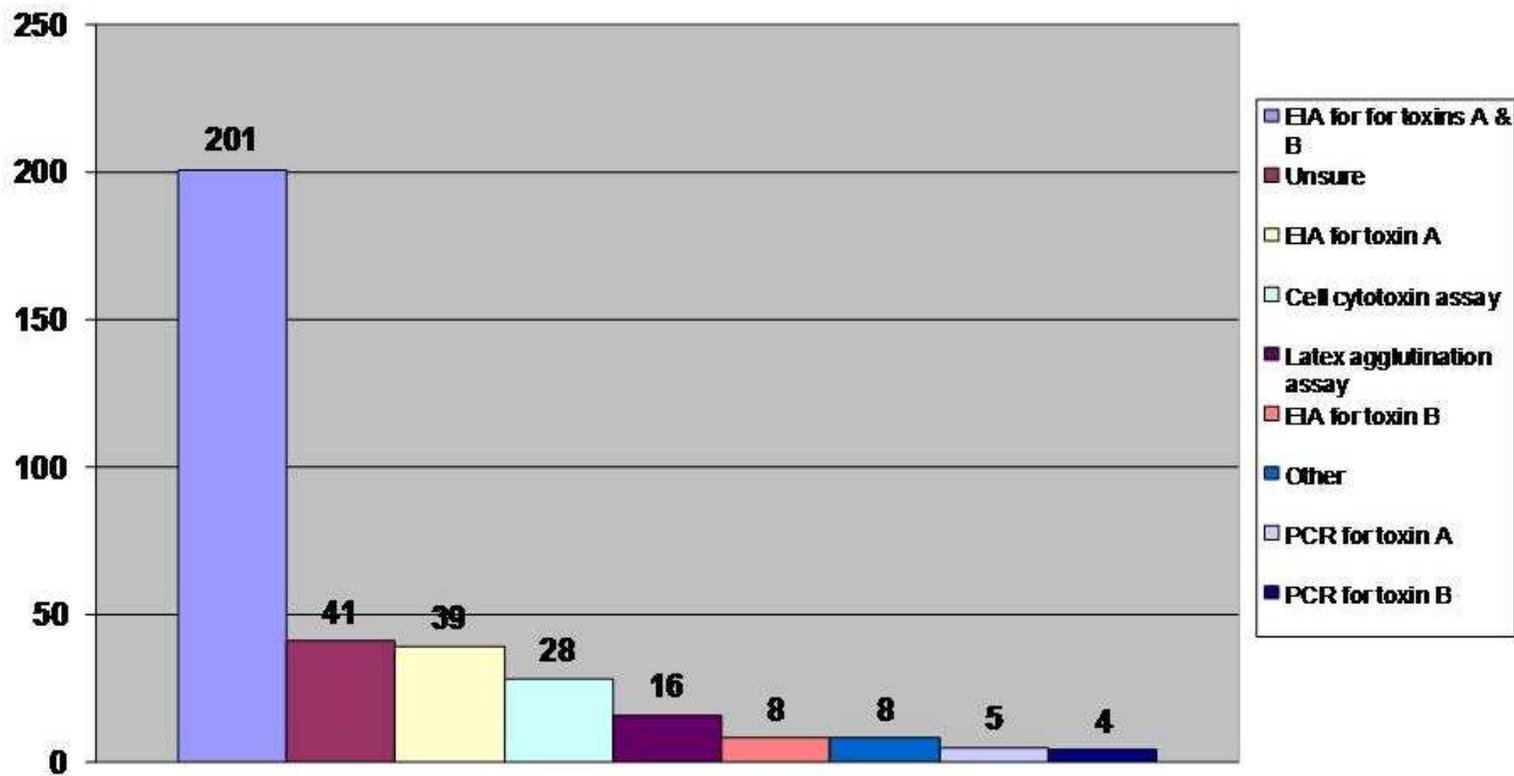
- Metodi non microbiologici:
  - Sintomatologia clinica
  - Endoscopia
- Identificazione del *C.difficile* :
  - Coltura
  - Glutamate dehydrogenase GDH
- Identificazione della Tossina
  - Ricerca della Tossina B
    - EIA
    - Test di citotossicità
  - Geni della Tossina (PCR)



<i>Test</i>	<i>Sensibilità</i>	<i>Specificità</i>
Endoscopia	~50%	~100%
Coltura	~90%-100%	~84%-100%
Citotossità cell	~70%-100%	~90%-100%
GDH* Latex	~58%-92%	~80%-96%
EIA Tossina A/B	~79%-80%	~98%



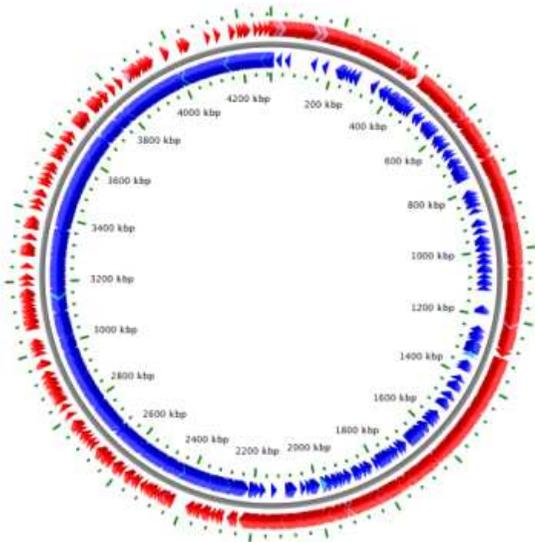
*Diagnosi di laboratorio di infezione da Clostridium difficile*



*Bassa sensibilità basso valore predittivo negativo*

i saggi molecolari ci aiutano

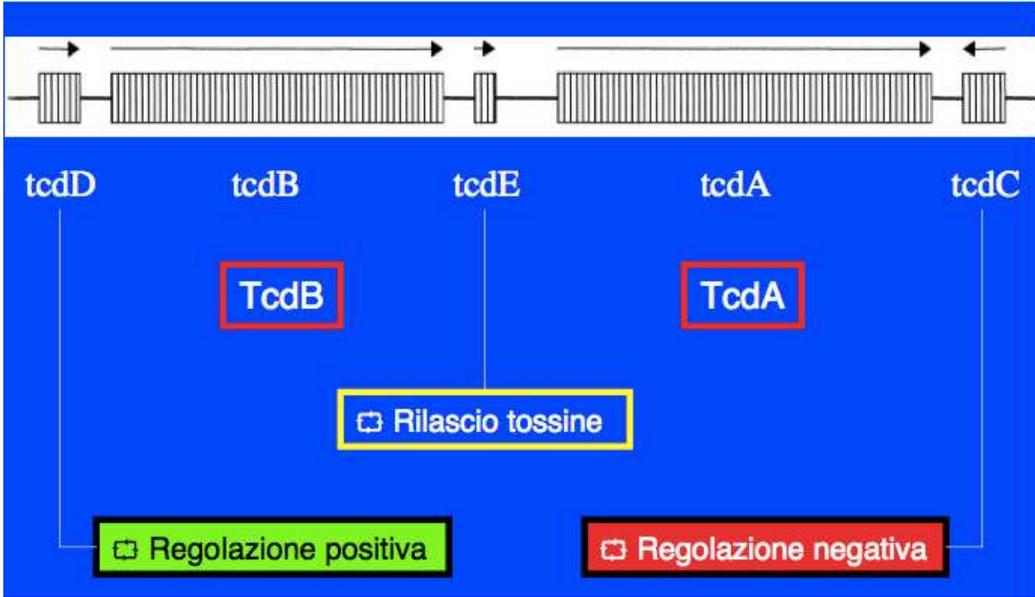
*Clostridium difficile* 630, complete genome



Accession: NC\_009089

Topology: circular; Length: 4,290,252 bp; Genes: 3,927

*PaLoc Clostridium difficile*



Nel tentativo di aumentare la sensibilità dei test, si ricorre alla biologia molecolare: la PCR eseguita sul campione fecale ha una sensibilità superiore a quella della metodica EIA ; il limite di determinabilità è di  $1 \times 10^5$  batteri per grammo di feci (con una sensibilità del 100% e una specificità del 94% rispetto al test di citotossicità) e un buon turn-around time.

**Sensibilità: 100%**

**Specificità: 93%**

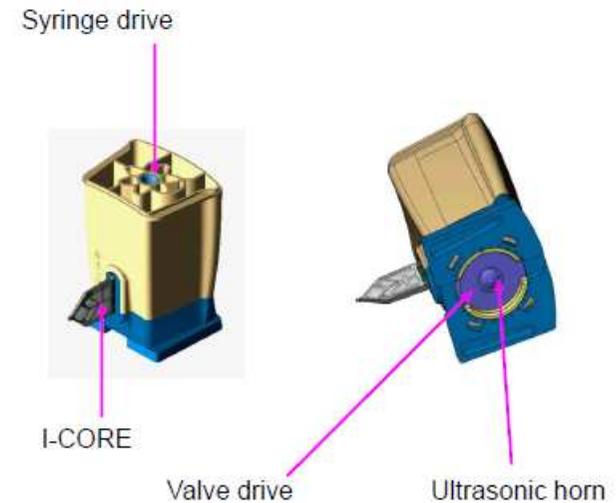


## *Xpert Clostridium difficile*

### Problemi

- Gestione dei pazienti con forte sospetto clinico ma con risultato “*C.difficile* Negativo”
- Sono necessari più test diagnostici per confermare l’infezione *C.difficile*

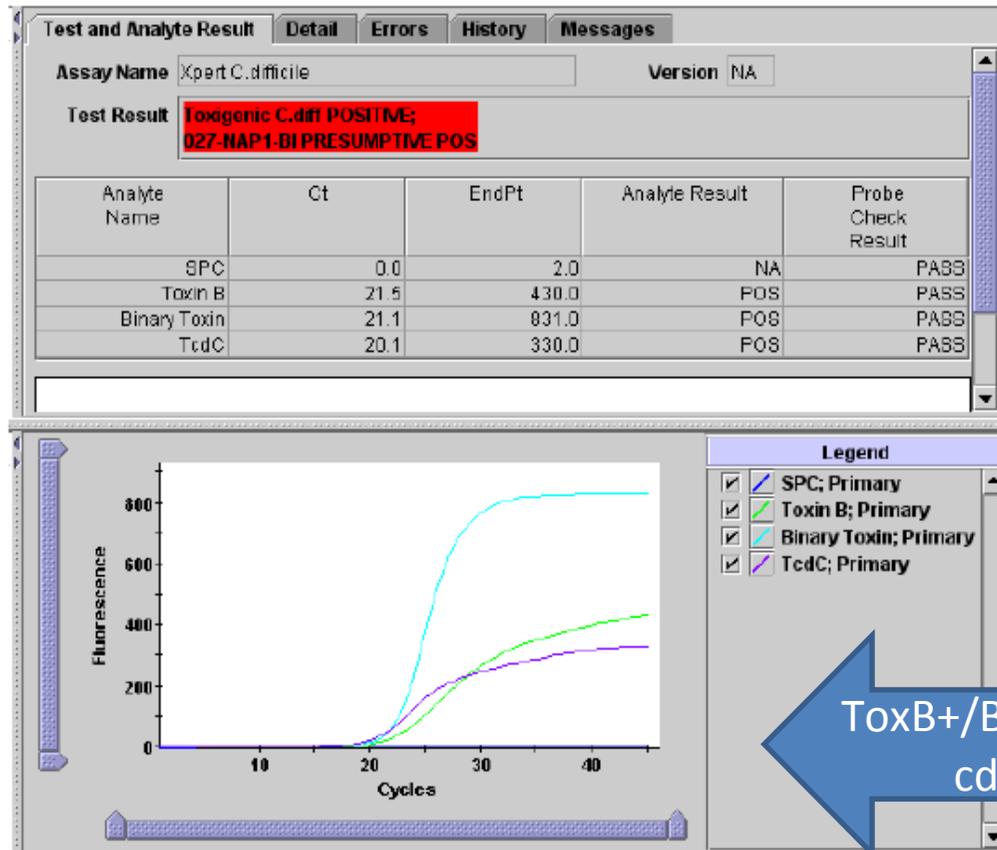
Impatto significativo sull’identificazione della diagnosi: perdere tempo nella diagnosi, nel trattamento e nel controllo conseguente dell’infezione può aumentare i costi e la diffusione dell’infezione



### GeneXpert®

- Incrementano i costi
  - Incrementa l’ospedalizzazione del paziente
  - Incrementa il tasso di mortalità
- ➔
- Diagnosi di CDI in 45 minuti
  - Determina se isolare o non isolare il paziente
  - Determina l’ottimale opzione terapeutica
  - Riduce il numero di pazienti in follow-up
  - Riduce la trasmissione a livello familiare e comunitario

Trova tre target: Toxin B, Binary Toxin, delezione tcdC.



Tox B+/Binary+/tcdC+:

ceppo epidemico NAP1/027/BI

Considerare la vancomicina

orale, discontinuare i chinoloni

(moxifloxacina)

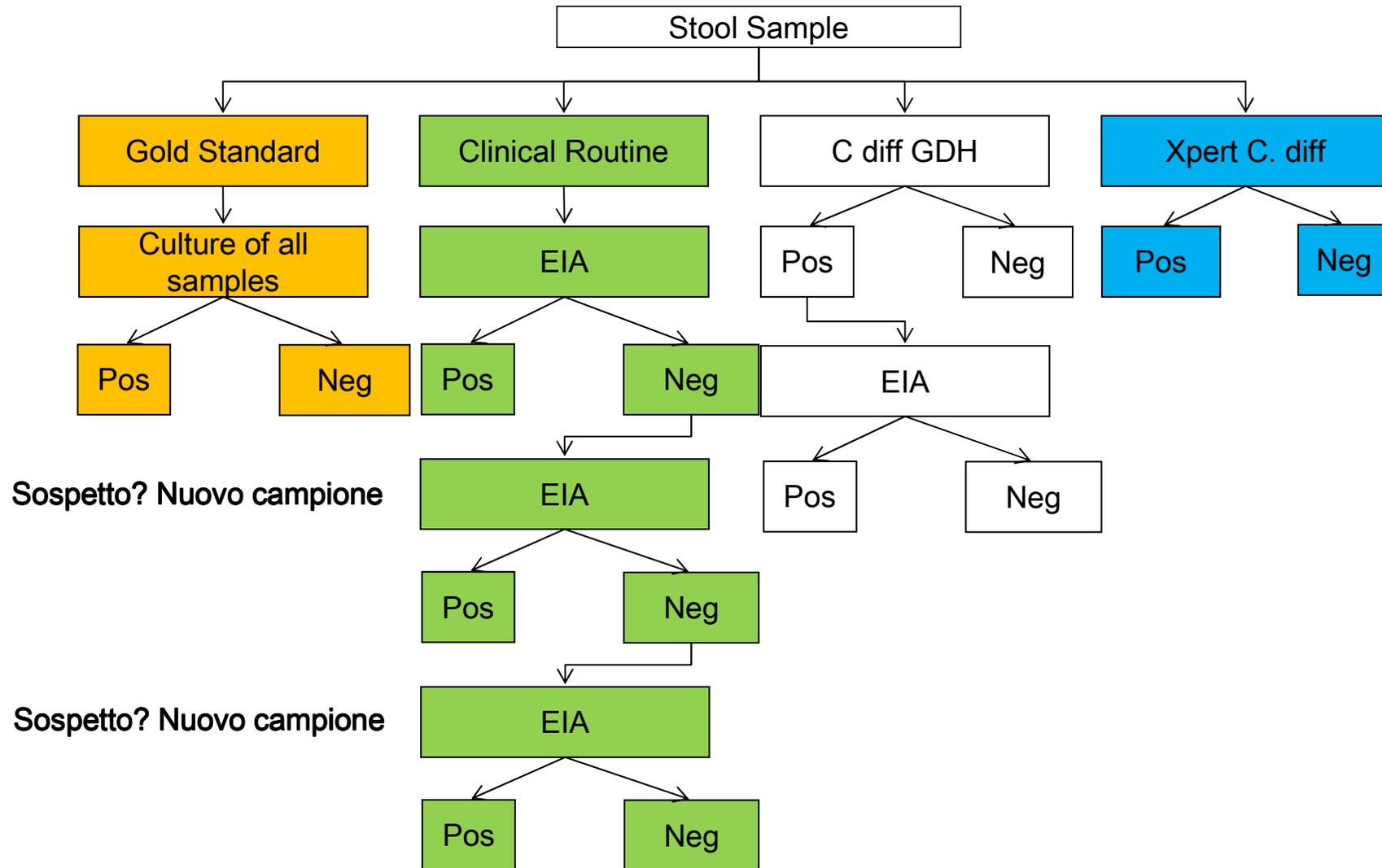
O78: anche tossina binaria

ToxB+/Binary+/tcdC+

Nel periodo gennaio - dicembre 2012 sono pervenuti al nostro laboratorio, da reparti ospedalieri, ambulatori esterni e residenze protette, 1929 campioni di feci per diagnosi di infezione da *C.difficile*. In base ai criteri di appropriatezza diagnostica sono stati giudicati idonei i campioni rientranti nei gradi 5-7 della *Bristol stool chart* per cui 216 sono stati scartati. I restanti 1713 sono stati processati con PCR RealTime in microfluidica *GeneXpert* (Cepheid). 473 pazienti (27.6%) sono risultati positivi per la presenza di *C.difficile* tossinogenico; di questi 34 (2.0%) erano positivi anche per tossina binaria, genotipo riconducibile al ribotipo O78. Nessun campione è risultato appartenere al ribotipo BI/NAP I.

rapidità di risposta con una buona sensibilità

## Algoritmi diagnostici



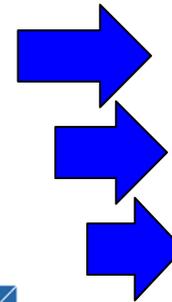
## Prevention Strategies: Evaluate and optimize test-ordering practices and diagnostic methods

Consider more sensitive diagnostic paradigms but apply these more judiciously across the patient population

- Employ a highly sensitive screen with confirmatory test or a PCR-based molecular assay
- Restrict testing to unformed stool only
- Focus testing on patients with >3 unformed stools within 24 hours
- Require expert consultation for repeat testing within 5 days

### Bristol Stool Chart

Type 1		Separate hard lumps, like nuts (hard to pass)
Type 2		Sausage-shaped but lumpy
Type 3		Like a sausage but with cracks on its surface
Type 4		Like a sausage or snake, smooth and soft
Type 5		Soft blobs with clear-cut edges (passed easily)
Type 6		Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool
Type 7		Watery, no solid pieces. <b>Entirely Liquid</b>



## Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA/SA)

In the hospital, people who are more likely to get an MRSA infection are people who:

have other health conditions making them sick  
have been in the hospital or a nursing home  
have been treated with antibiotics.



*Staphylococcus aureus* MRSA occupa una posizione predominante:

- in rapporto all'incidenza
- alla gravità dei quadri clinici



Il laboratorio di Microbiologia gioca un ruolo fondamentale

## The need for speed in microbiological diagnosis



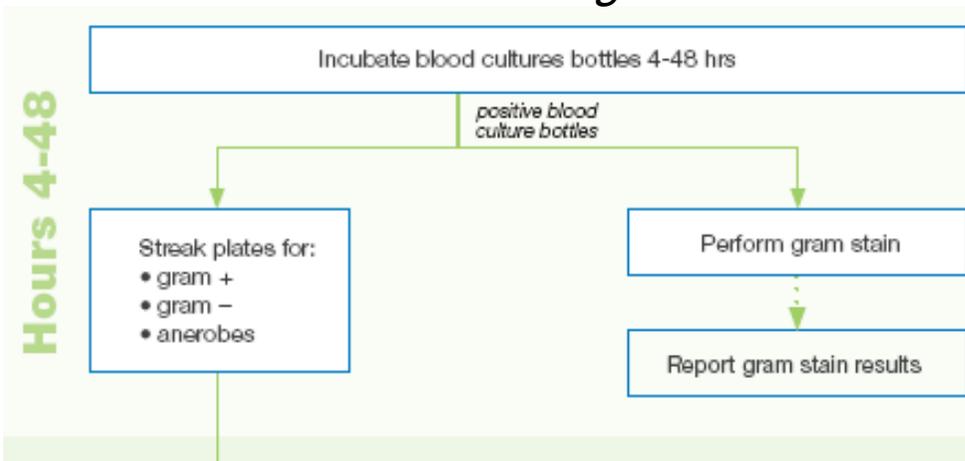
Una rapida identificazione di MRSA/MSSA, soprattutto in una sepsi, diventa fondamentale per la corretta gestione e il trattamento del paziente, con conseguente riduzione della morbilità e della mortalità.

Vanno identificate le aree ed i contesti dove l'applicazione di tali metodiche potranno raggiungere il miglior rapporto costo/beneficio.

U.O. Microbiologia e Virologia Trento  
7 giorni su 7 su emocolture positive di reparti selezionati:  
Terapia Intensiva (Anestesia/Rianimazione e UCIC)  
Malattie Infettive  
Oncologia medica e Radioterapia oncologica  
Ematologia  
Nefrologia  
Pronto Soccorso

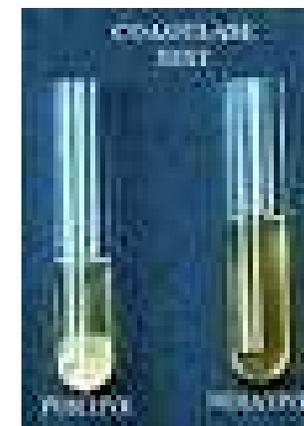
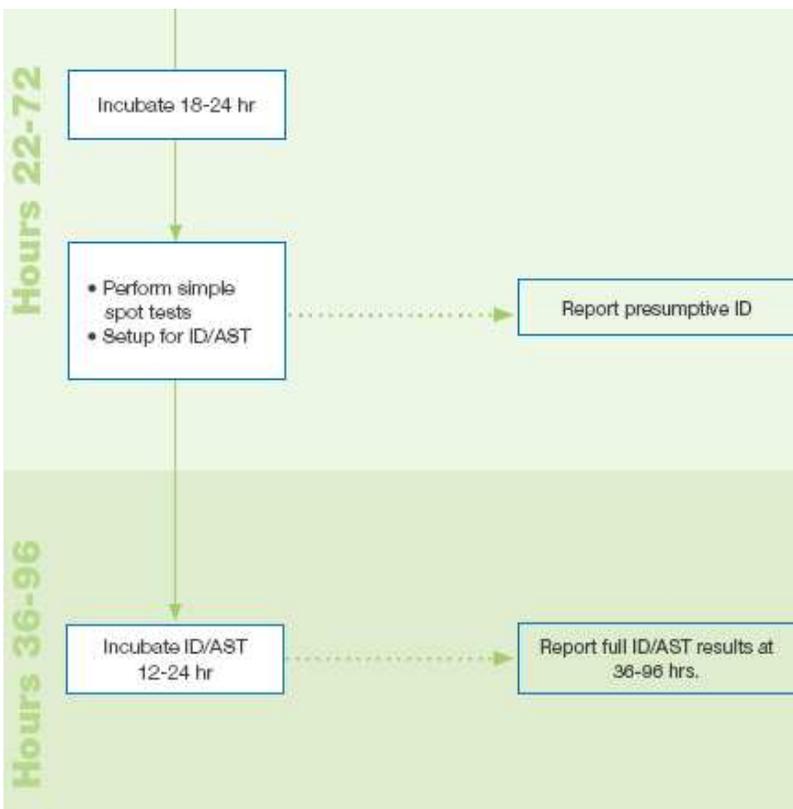


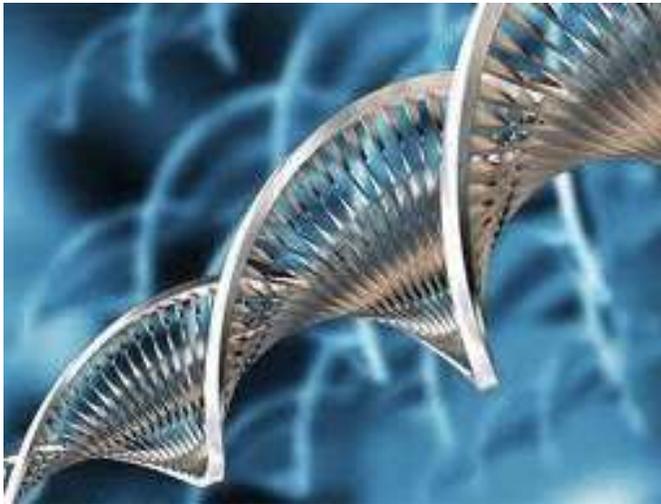
# Laboratorio di Microbiologia



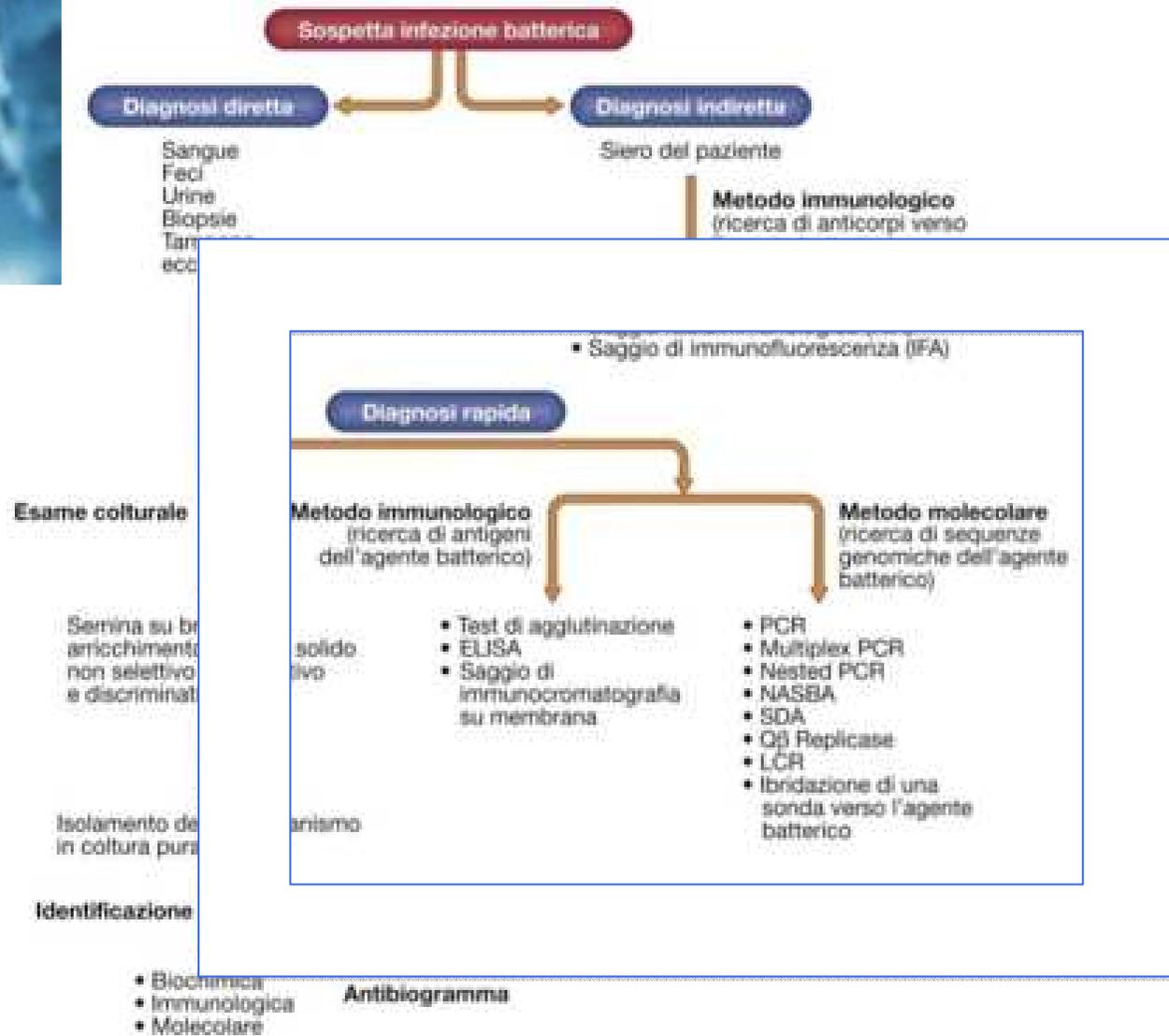
## diagnostica tradizionale

La disponibilità di strumenti dotati di maggiore sensibilità e rapidità rappresenta un significativo vantaggio per il clinico e per il paziente





## nuove tecnologie



# MRSA/SA da emocolture positive

24 ore / giorno

7 giorni su 7

60 minuti

## MRSA

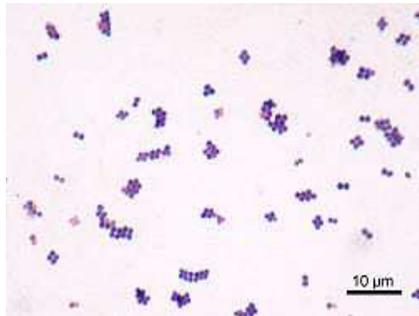
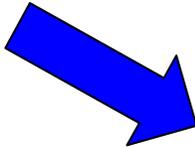
Sensibilità 98.3%

Specificità 99.4%

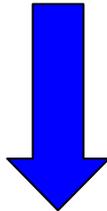
## MSSA

Sensibilità 100%

Specificità 98.6%



Cocchi Gram positivi

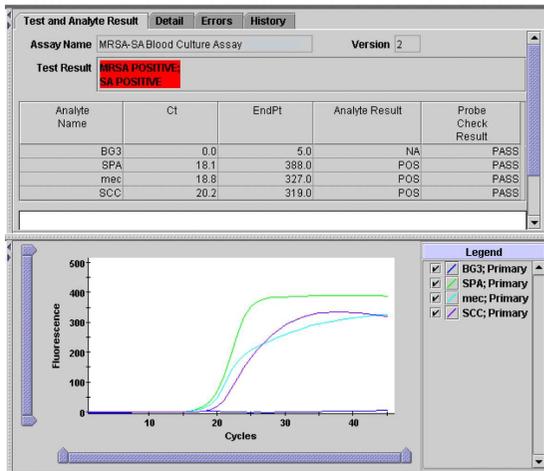
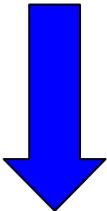


Setup Xpert™ MRSA/SA BC Test



Bactec® per anaerobi    Bactec® per aerobi

4-48 ore



In less than one hour:

- Report GPCC gram stain results
- Report Xpert results
  - SA positive
  - MRSA positive
  - SA and MRSA negative

## Metodi commerciali di tecnologia molecolare



BD Gene-Ohm  
(High complexity)



FilmArray Biofire  
(Moderate complexity)



Cepheid  
GeneXpert  
(Moderate complexity)



BioMerieux NucliSens  
EasyQ  
(High complexity)



Roche LightCycler  
(High complexity)

Nanosphere Verigene  
(Moderate complexity)



# Targets utilizzati per MRSA

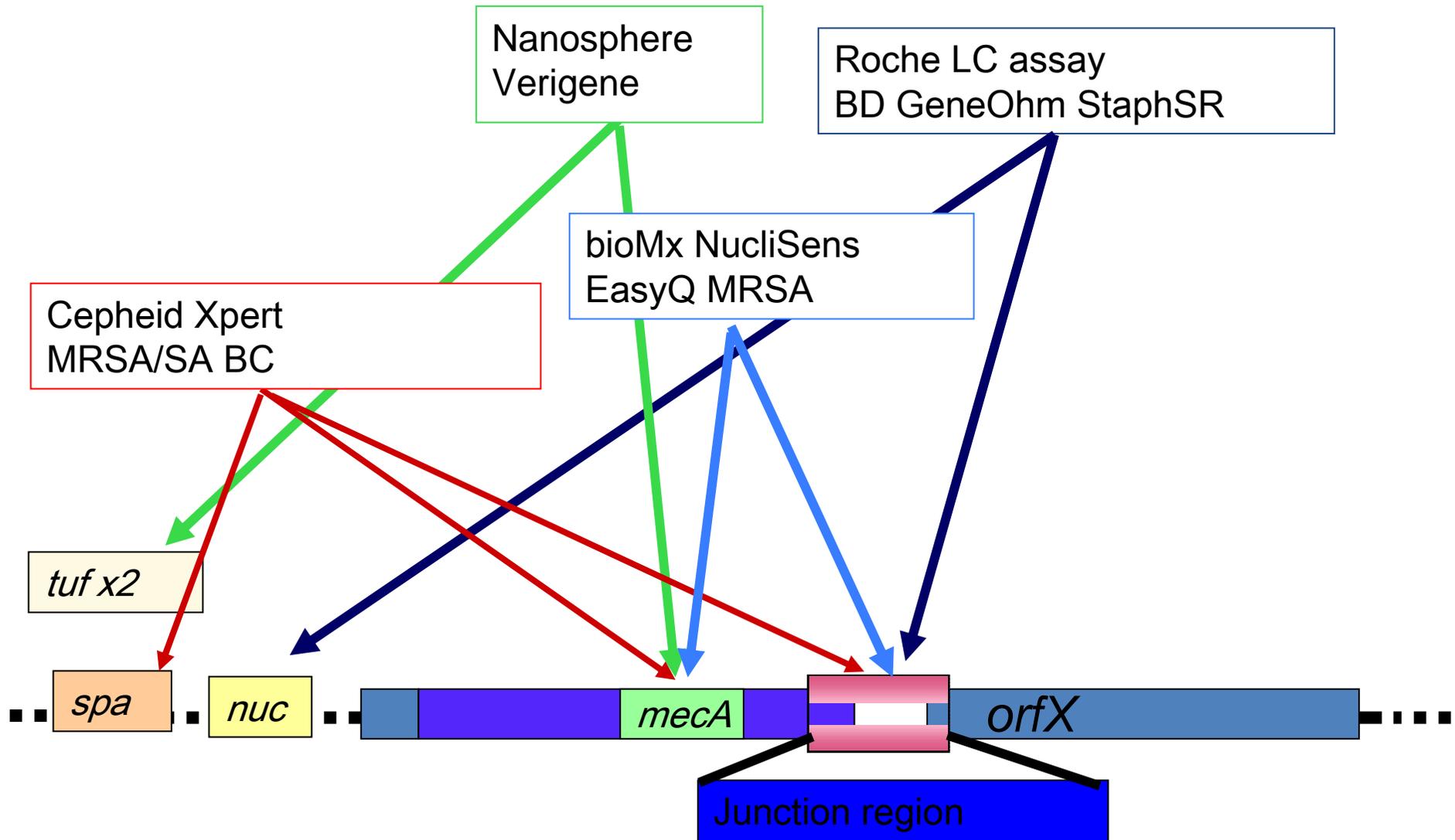
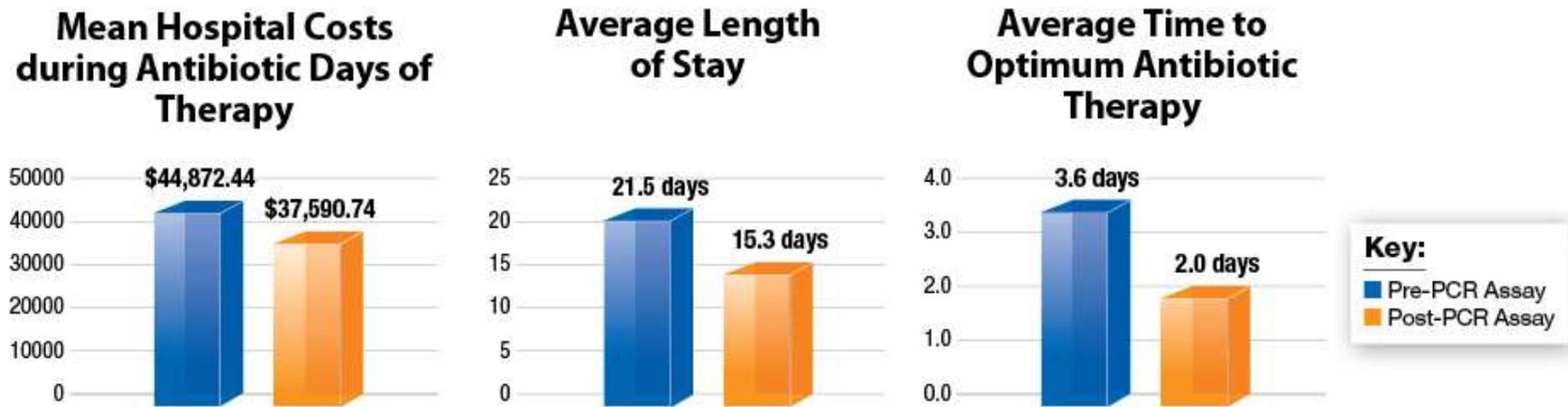
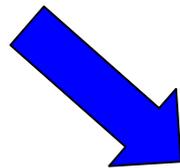


Figure 1. Results of PCR Assay Implementation



L'utilizzo delle nuove tecnologie rapide può diminuire in maniera significativa:

- Tempo di diagnosi
- Tempo di degenza
- Costi relativi ai trattamenti terapeutici



potenziare i vantaggi della antimicrobial stewardship



# Gestione del caso in terapia intensiva

1^ : batterioscopico Gram



2 o più flaconi di emocoltura positivi  
o caso particolare

2^ : esito GeneXpert



Infermiera epidemiologa :  
terapia antibiotica prima e  
dopo la 2^ comunicazione

Metodo	
Informazione per l'indicare di <i>Staphylococcus</i> spp. mediante Test molecolare	
PACIENTE   _____	
Data di nascita _____	Espresso <u>MCCO1A/MSA3</u>
COD-ID: _____	Inteso di _____
<input checked="" type="checkbox"/> SVP (sangue da vena periferica)	N° flaconi positivi <u>8</u>
<input type="checkbox"/> SVC (sangue da catete vena centrale)	N° flaconi positivi _____
<input type="checkbox"/> SCP (sangue da catete vena periferica)	N° flaconi positivi _____
<input type="checkbox"/> AS (sangue arterioso)	N° flaconi positivi _____
<b>TEST MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE DI <i>Staphylococcus</i> spp.:</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Staphylococcus aureus</i> Meticillina-sensibile (MSSA)	
<input type="checkbox"/> <i>Staphylococcus aureus</i> Meticillina-resistente (MRSA)	
<input type="checkbox"/> <i>Staphylococcus</i> spp. negativi Meticillina-sensibile (MSSa)	
<input type="checkbox"/> <i>Staphylococcus</i> spp. negativi Meticillina-resistente (MRSA)	
Data _____	Firma del microbiologo _____
P.B. Si prega di riportare su locazione per essere a fianco della cartella come presenza di ogni item di infezione	
Completare la parte inferiore e restituire in C.O. Microbiologia al n° 02/2601603	
Terapia antibiotica e dosaggi prima della presenza comunicazione _____	
_____	
Terapia antibiotica e dosaggi dopo la presenza comunicazione _____	
_____	
Data inizio infezione _____	Data fine infezione _____
Firma del Medico di reparto _____	

# Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study

Chiamato *mecC*

*mecC* conferisce resistenza ma non viene riconosciuto dalle metodiche molecolari

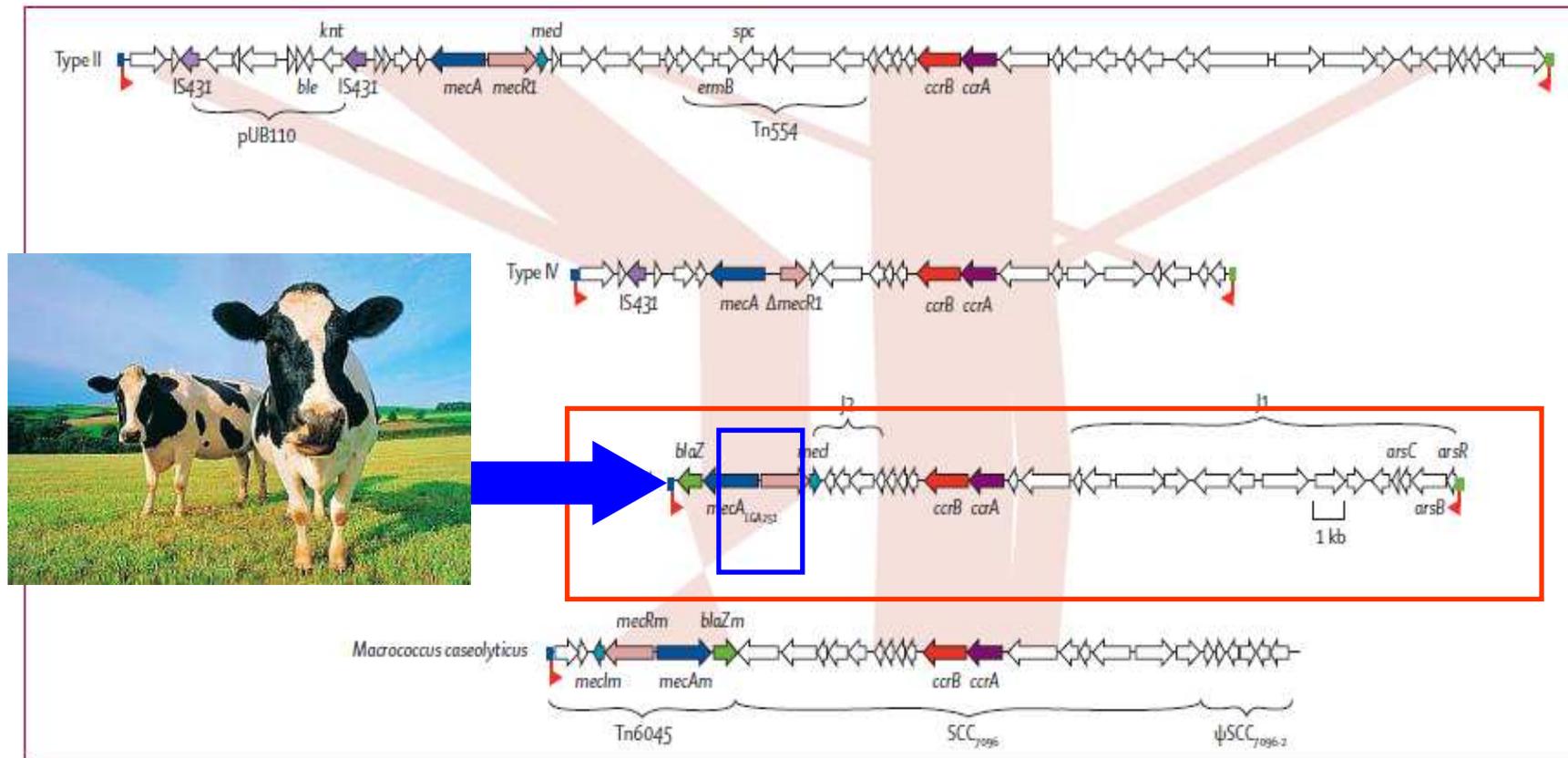
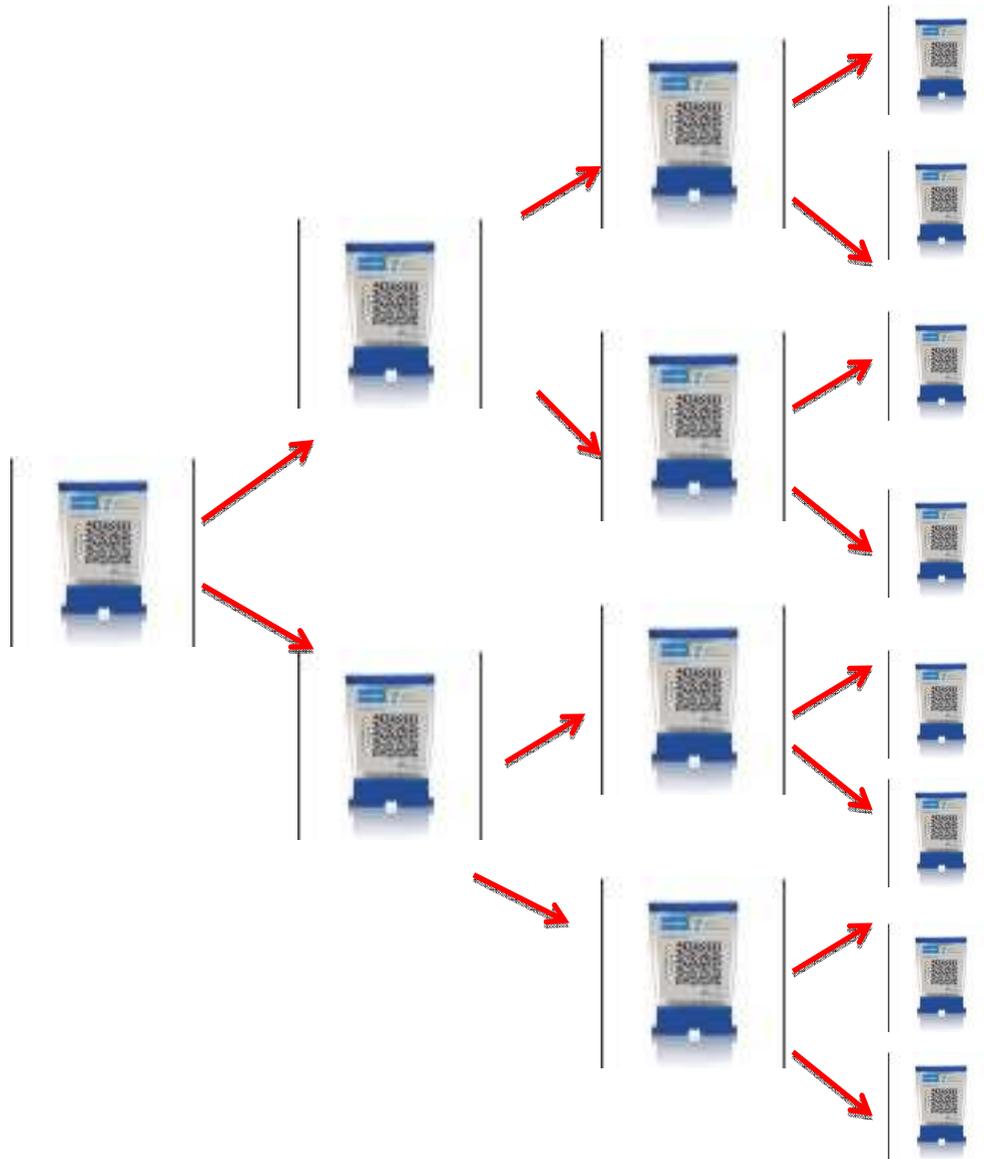


Figure 1: Comparison of the type XI SCCmec of LGA251 with other SCC elements

Le sfide per il futuro:  
Ricerca diretta da sangue del paziente, Nuovi tipi *mec* (*mecC*)





## AUGURIO

La piattaforma  
GeneXpert si  
ampli di nuove  
test per coprire  
tutte le esigenze  
infettivologiche !!!