

# Sviluppi della fluorescenza *in situ* nella diagnostica precoce delle emocolture

Edoardo Carretto

S.C. Microbiologia

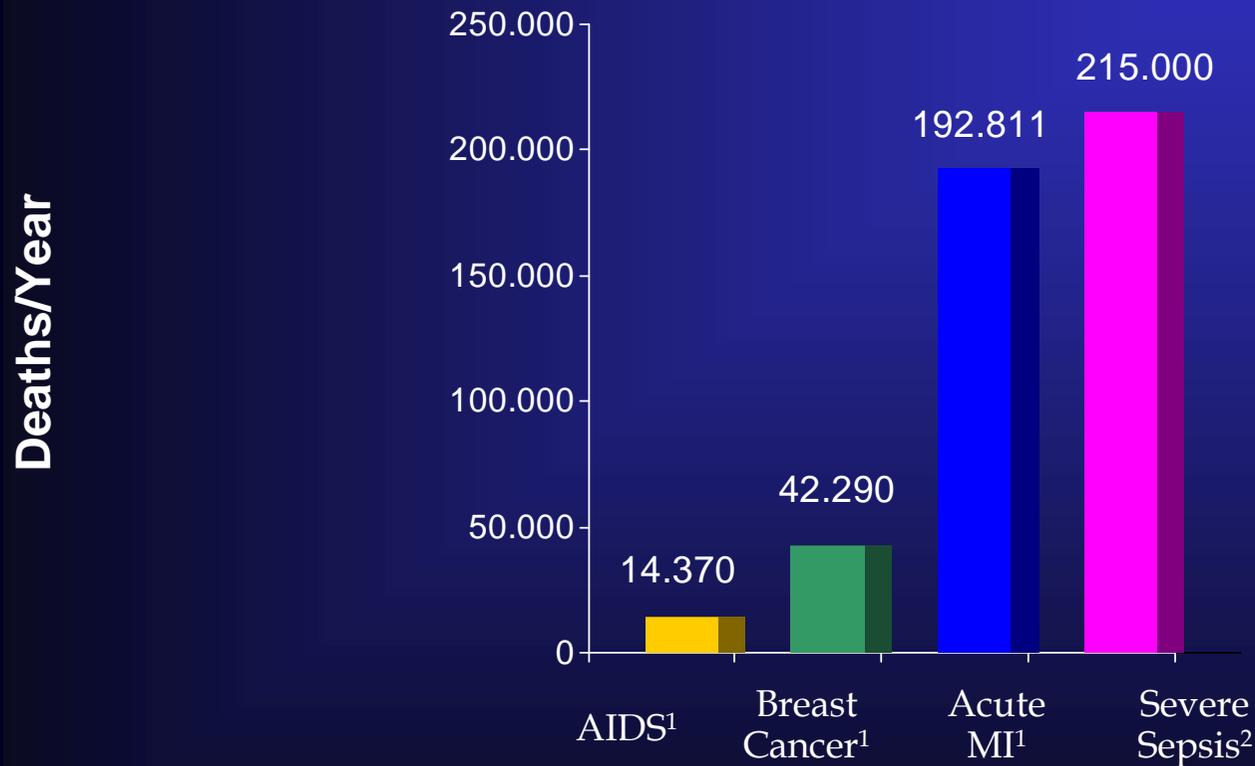
IRCCS Arcispedale Santa Maria Nuova – A.O. Reggio Emilia

“Workshop Euroclone/Neomed: le proposte di Euroclone Diagnostica per le urgenze infettive”

3° Congresso NewMicro

Padenghe sul Garda (BS), 20-22 marzo 2013

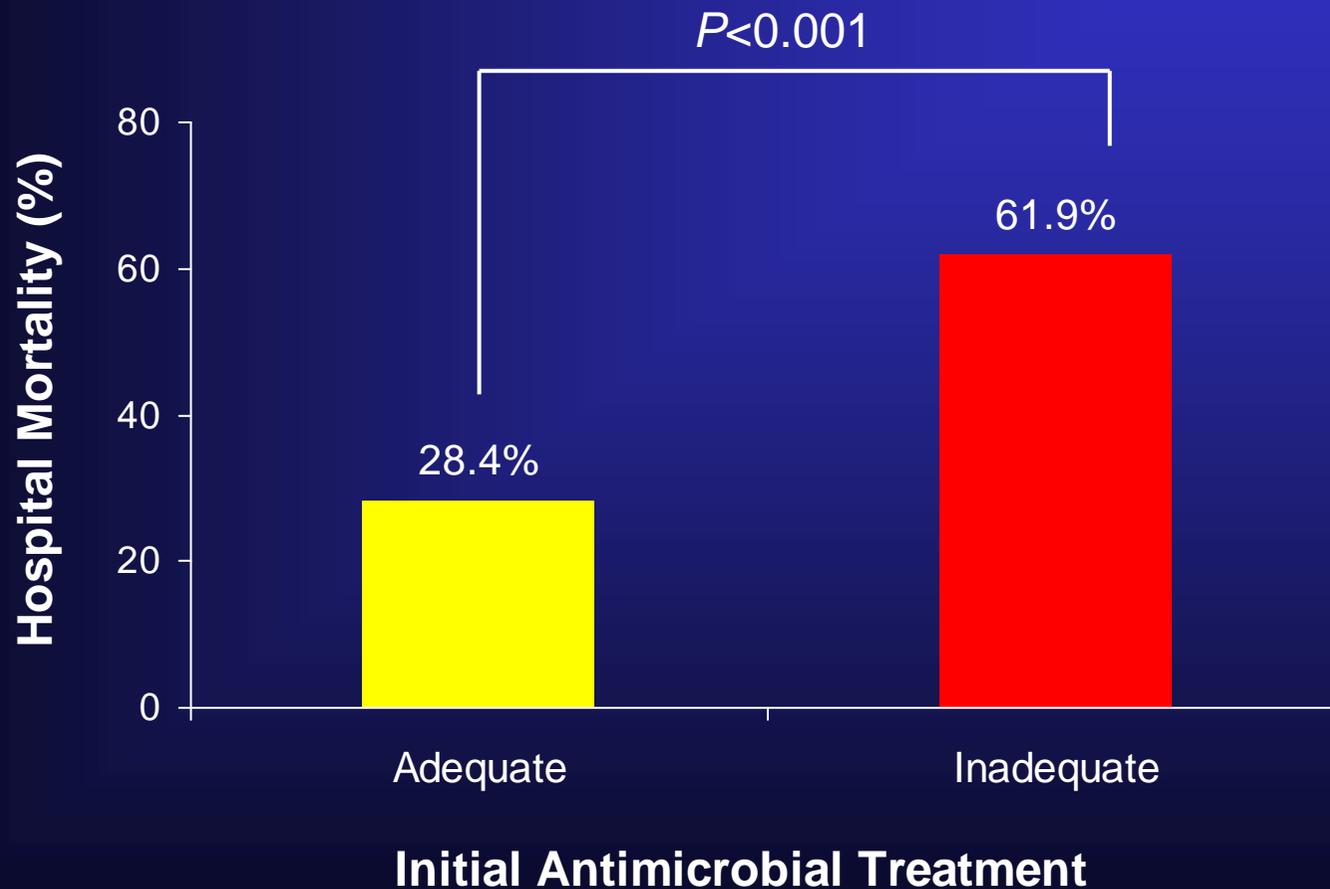
# Mortalità della sepsi severa comparata con altre patologie



1. Minino AM, Smith BL. *National Vital Statistics Reports*. 2001;49:1-40.

2. Angus DC, et al. *Crit Care Med*. 2001;29:1303-1310.

# Trattamento inadeguato delle sepsi



# La riduzione del TAT

- La riduzione del turn around time (TAT) nell'ambito delle emocolture rappresenta uno degli obiettivi prioritari per il microbiologo
- **Metodologie:** tecniche basate sulla PCR real-time da campione clinico. Richiede expertise ed è molto costosa; inoltre presuppone un'organizzazione del workflow che garantisca lo stesso approccio per tutti i pazienti; non offre significativi vantaggi per i campioni che pervengono oltre una certa soglia oraria
- **Approcci alternativi:** si basano sulla possibilità di lavorare sui flaconi di emocoltra che si sono positivizzati (spettrometria di massa; ibridizzazione *in situ* con rilevazione in fluorescenza; PCR real-time).

# IRCCS Arcispedale Santa Maria Nuova

- Il Laboratorio di Microbiologia esegue esami per l'ospedale (923 posti letto, recentemente divenuto IRCCS per Oncologia e modelli assistenziali) e per parte dei presidi dell'AUSL (ospedali per acuti e lungo-degenze), nonché per alcune strutture di lungodegenza territoriali (complessivamente, altri 400 posti letto)
- Reparti maggiormente rappresentati: Medicina, Oncologia, Malattie Infettive, Pneumologia, lungodegenze varie.

# IRCCS Arcispedale Santa Maria Nuova

- Nel 2012 eseguite più di 12.000 emocolture (set aerobi-anaerobi), con emocolture/letto/anno (solo aerobi): 12,77.
- Microrganismi più frequentemente isolati nel 2012: *E. coli* (302), *S. aureus* (118), *S. epidermidis* (107), enterococchi (88), *Candida* (65, 44 *albicans*), altri SCN (46), *Klebsiella pneumoniae* (45), *Pseudomonas aeruginosa* (38).
- Dal giugno 2011: implementazione sostanziale delle procedure nel settore, con esecuzione, fra l'altro, della PNA-FISH su enterococchi e lieviti.

### Algoritmo processazione emocolture A

La procedura deve essere eseguita:

- ① alla mattina, ore 8.00
- ② al pomeriggio, ore 12.00 e ore 16.00

Per emocolture positivizzate alle ore 16.00 o oltre, riferirsi all'algoritmo B

Emocoltura positiva

Gram  
Letture entro 30 minuti

Negativo: reincubare il flacone ENTRO 2 ORE

Positivo: cocci + (stafilococchi, streptococchi), bacilli -, bacilli +, lieviti

Comunicazione al reparto e segnalazione su registro (1)

Semina

Cocchi + tipo Stafilo

Cocchi + tipo Strepto

Lieviti

Bacilli -

Coagulasi diretta

PNA FISH

Semina su terreni selettivi (cromogeno, Sabouraud)

PNA FISH ?

Letture a 4 ore

*E. faecium*  
*E. faecalis*

PNA FISH

ATB diretto

Positivo

Negativo

(1)

Negativo

*C. albicans*  
*C. parapsilosis*  
*C. tropicalis*  
*C. krusei*  
*C. glabrata*

(1)

ID Vitek, ATB Vitek e manuale

Dopo 24 h ev. ID Vitek, ATB Vitek e manuale

Utili informazioni relative al paziente: polmonite pneumococcica? Endocardite da vindanti? Antigeni urinari?  
Subcoltivare l'emocoltura su AS aggiungendo dischetto di optochina, incubare in CO<sub>2</sub> 5%

Dopo 24 h ev. ID Vitek, ATB Vitek e manuale

Esecuzione RT-PCR per meticillino-resistenza

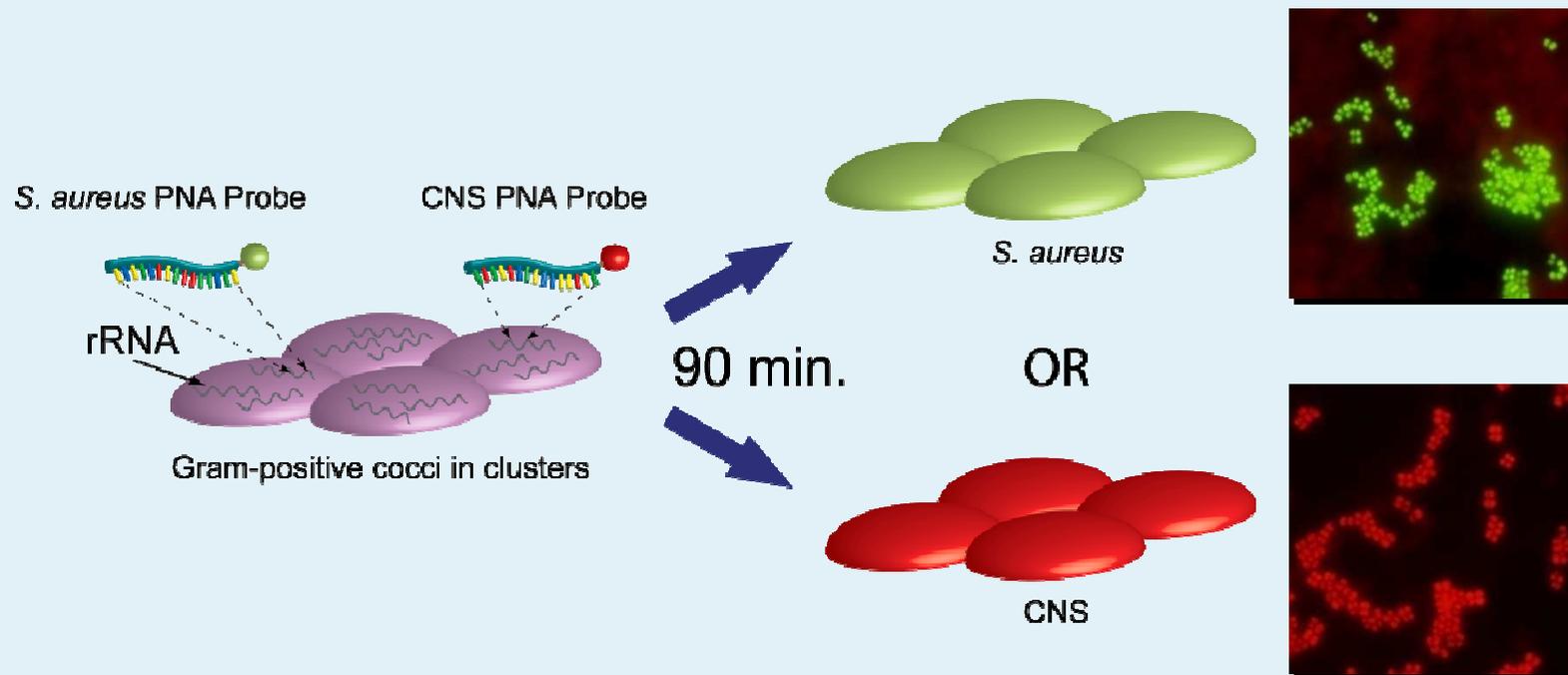
(1)

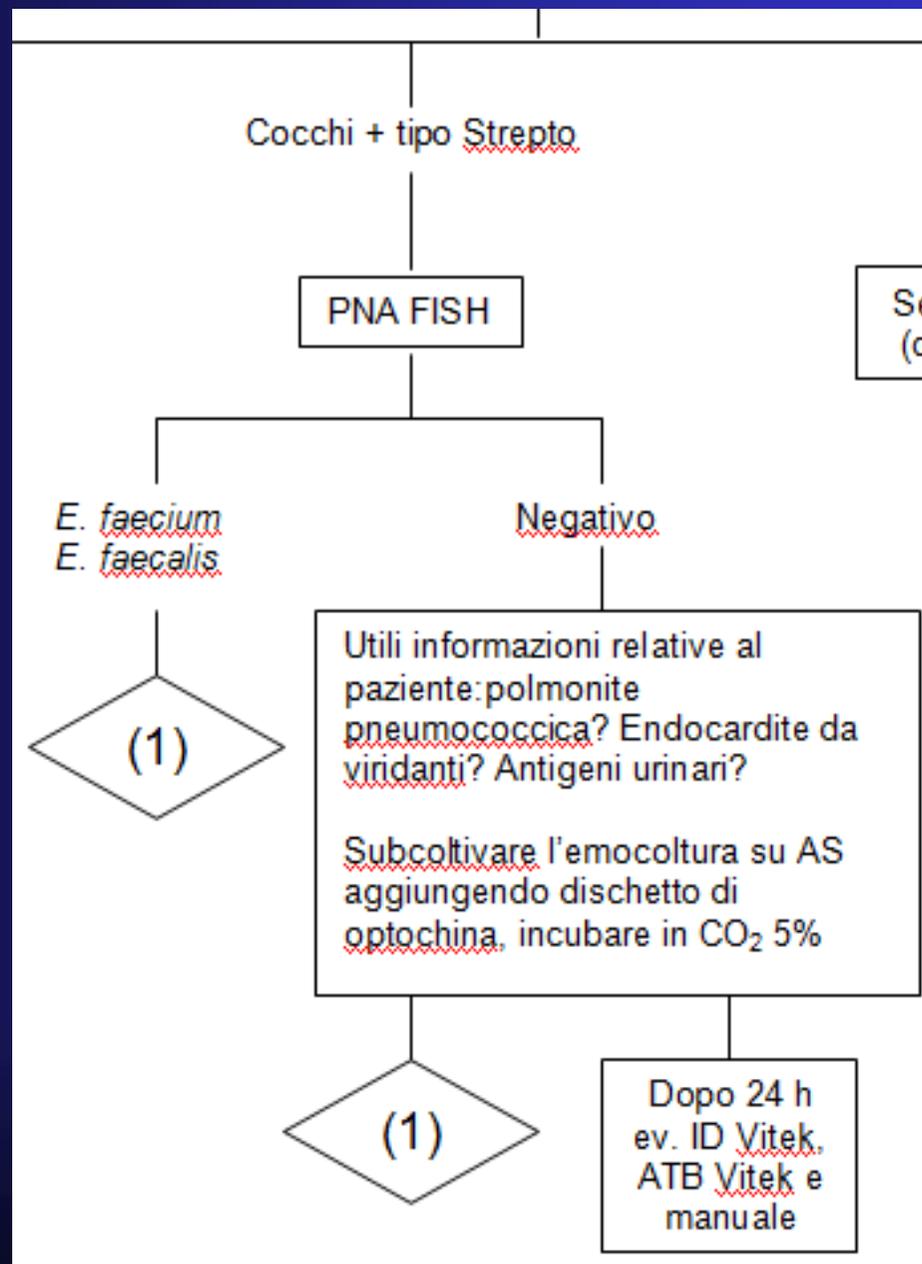
(1)

(1)

# PNA-FISH

**PNA FISH = Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization**





# Streptococchi in emocolture

- Colorazione di Gram: cocchi Gram+ appaiati o in catene
  - necessaria distinzione rapida fra *E. faecalis*, *E. faecium* o streptococchi differenti dagli enterococchi
- Nel sospetto clinico di infezione da enterococchi, la terapia empirica può basarsi su glicopeptidi (teicoplanina o vancomicina); in caso si tratti di streptococchi, andrà considerata terapia con ampicillina o ceftriaxone
- Descalation: *E. faecalis* può essere più utilmente trattato con ampicillina, mentre più del 90% dei ceppi di *E. faecium* sono resistenti a questo farmaco



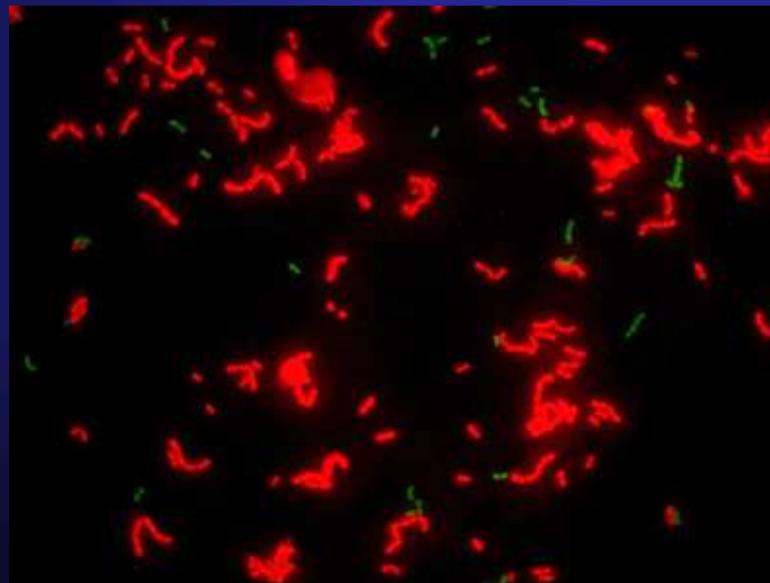
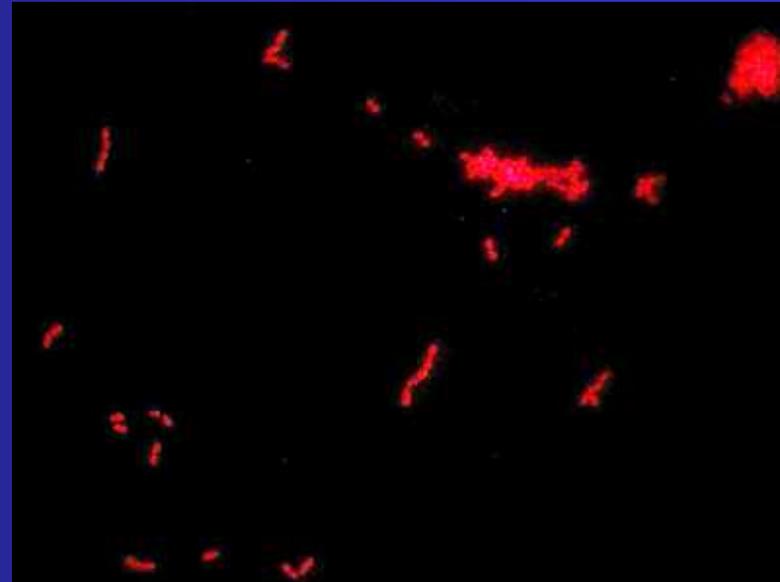
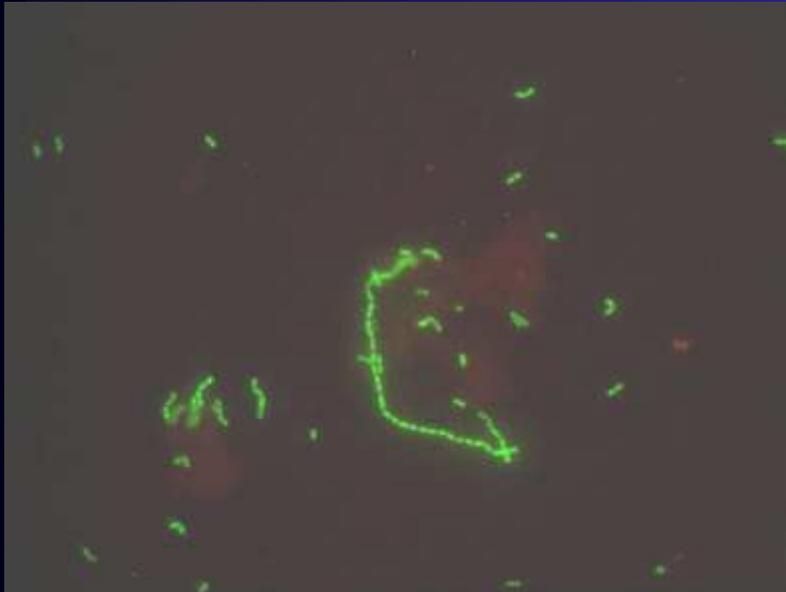
## Mortality in enterococcal bloodstream infections increases with inappropriate antimicrobial therapy

M. Suppli<sup>1</sup>, R. Aabenhus<sup>1</sup>, Z. B. Harboe<sup>1,4</sup>, L. P. Andersen<sup>2</sup>, M. Tvede<sup>1</sup> and J.-U. S. Jensen<sup>1,3</sup>

1) Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark, 2) Department of Infection Control, Rigshospitalet, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark, 3) Copenhagen HIV Programme (CHIP), University of Copenhagen, Panum Institute, Blegdamsvej, Copenhagen, Denmark and 4) Department of Bacteriology, Mycology and Parasitology, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark

### Abstract

*Enterococcus* species are common in nosocomial bloodstream infections and their incidence is rising. Although well recognized in several serious bacterial infections, the influence of appropriate antimicrobial therapy in enterococcal bacteraemia has not been fully settled. The aim of the study was to determine whether administration of inappropriate antibiotics in enterococcal bacteraemia is an independent risk factor for mortality, among other known and suspected risk factors. We conducted a cohort study of *E. faecalis/faecium* bacteraemia during a 3-year period at a single tertiary care hospital in Denmark. Patients with growth of non-enterococcus co-pathogens apart from the enterococcal bacteraemia were also included, as were patients with repeated enterococcal bacteraemia. Time to appropriate antimicrobial therapy was counted from the first episode. Appropriate antibiotic therapy was defined as any therapy with documented clinical effect, *in vitro* activity and a minimum treatment length of 6 days. Multivariate regression models were built to determine the independent risk factors for mortality. We included 196 patients with enterococcal bacteraemia. Appropriate antibiotics for at least 6 days were administered in 146 of these (74%). Thirty-day mortality was 26%. Multivariate logistic regression identified independent predictors of 30-day all-cause mortality: appropriate antimicrobial therapy for  $\geq 6$  days (odds ratio for mortality 0.33, 0.14–0.79), ICU admission (4.2, 1.7–10), thrombocytopenia (3.9, 1.6–9.3), chronic liver failure (3.3, 1.1–10) and age  $\geq 60$  years (2.2, 0.99–5.0). Antibiotics not appropriately covering enterococci are frequently administered empirically in suspected bloodstream infections. Inappropriate antibiotic therapy was an independent risk factor for mortality in enterococcal bacteraemia.



# Comparazione fra coltura e PNA-FISH

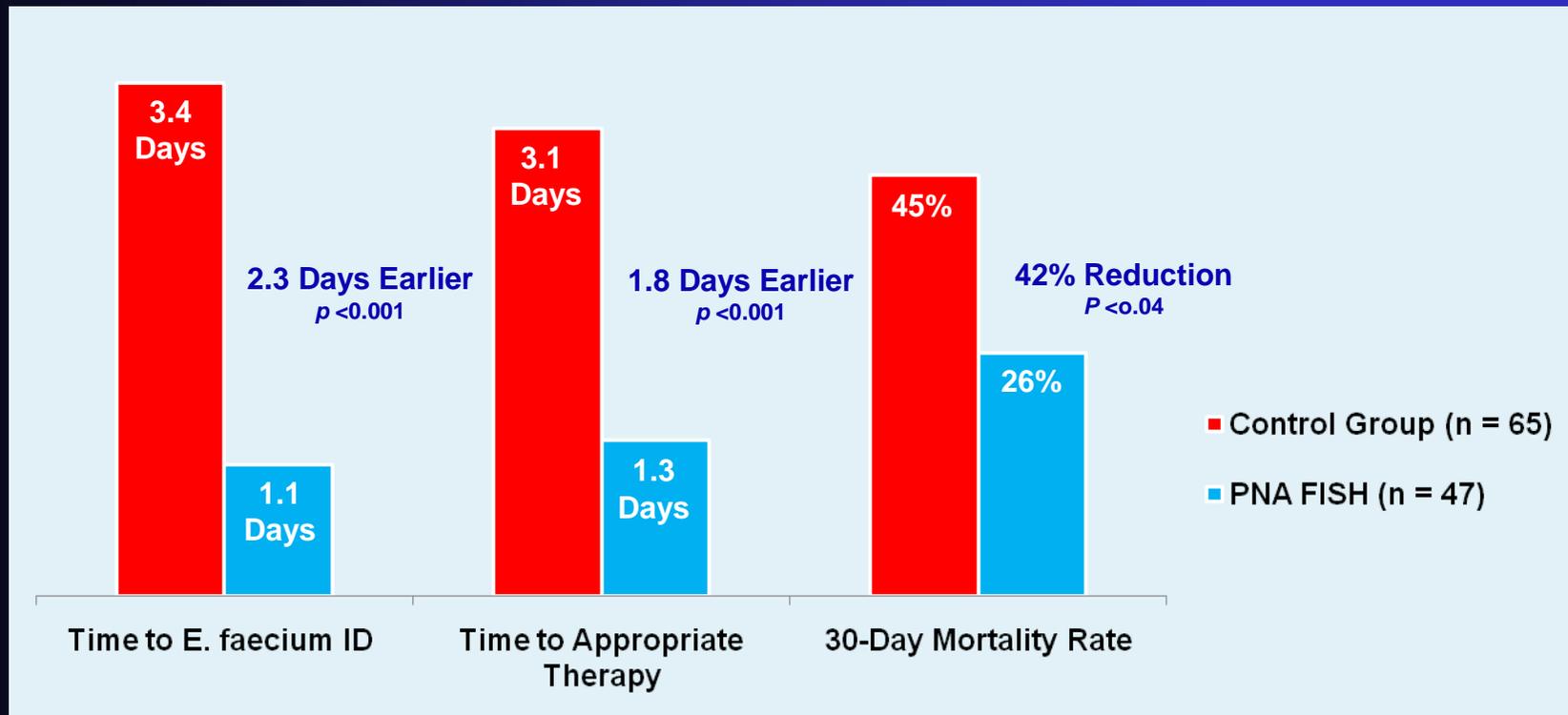
periodo: 01.07.11 – 30.09.12

Identificazione biochimica/ enzimatica	PNA FISH				TOTALI
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	altri enterococchi	altri streptococchi	
<i>E. faecalis</i>	65	0	0	1	66
<i>E. faecium/AE</i>	0	37	4	0	41
altri streptococchi	0	0	0	83	83
<b>TOTALI</b>	<b>65</b>	<b>37</b>	<b>4</b>	<b>84</b>	<b>190</b>

# Comparazione fra coltura e PNA-FISH

- Nella nostra esperienza la PNA-FISH ha dimostrato eccellenti sensibilità e specificità comparata con tecniche identificative standard.
  - *E. faecalis* sensibilità 98,48%, specificità 100%
  - *E. faecium/AE* sensibilità 100%, specificità 100%
  - Non enterococchi sensibilità 100%, specificità 100%
- Nessuno degli 83 streptococchi diversi da enterococchi è risultato ibridizzare con i probes specifici (21 *Streptococcus pneumoniae*, 15 *Streptococcus mitis* group, 13 streptococchi  $\beta$ -emolitici (gruppi A, C, F, G), 10 *Streptococcus bovis* group, 24 altri).
- La PNA-FISH ha permesso di documentare in 3 casi infezioni miste (*E. faecalis* + *E. faecium*) che non sarebbe stato agevole documentare da colture primarie
- In circa il 40% dei casi l'informazione telefonica ha comportato uno shift terapeutico.

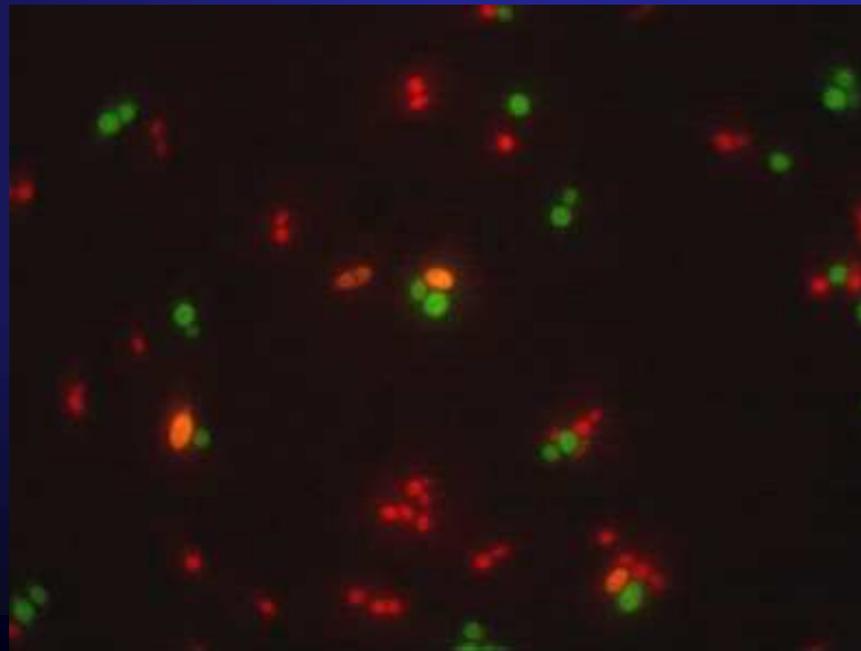
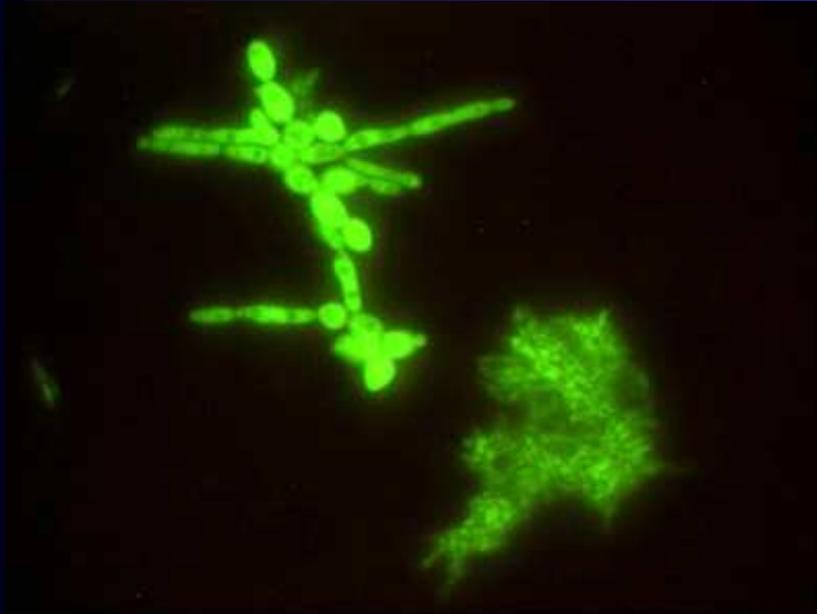
“PNA FISH identified *Enterococcus faecium* a median 2.3 days earlier and was associated with statistically significant reductions in the time to initiating effective therapy and decreased 30-day mortality.”



Forrest et al. Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization for hospital-acquired enterococcal bacteremia: delivering earlier effective antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Oct;52(10):3558-63.

# Candidemia

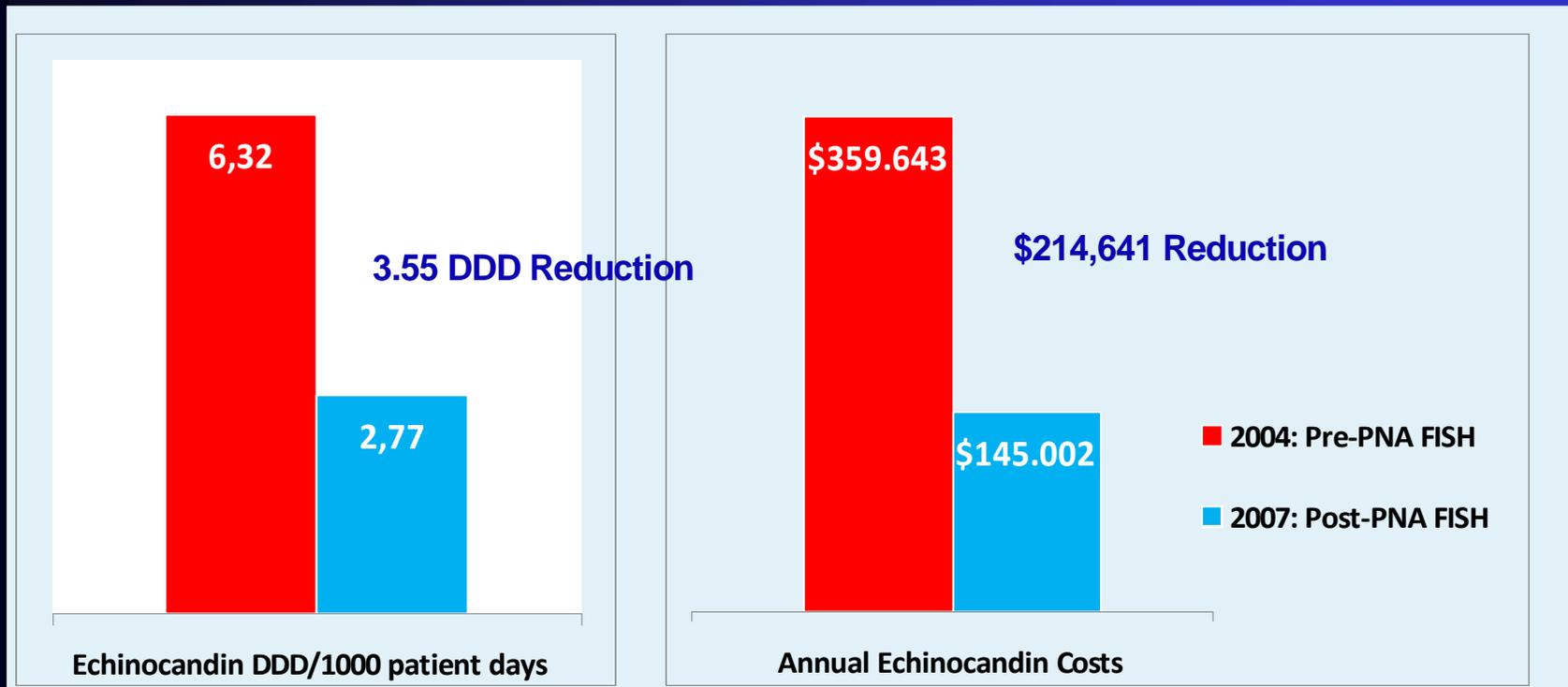
- E' essenziale per il clinico assicurare una terapia appropriata nel minor tempo possibile, che tenga altresì conto del controllo dei costi.
  - Alcune specie di *Candida* non possono essere trattate con fluconazolo o con altri azoli (*C. krusei*, e la maggioranza dei ceppi di *Candida glabrata*).
  - Pappas et al. sottolineano come, nel trattamento delle infezioni sostenute da *C. parapsilosis*, il fluconazolo sia da preferirsi alle echinocandine (B-III).
  - La quasi totalità dei ceppi di *C. albicans* sono sensibili al fluconazolo; i breakpoints delle echinocandine sono in continua rivisitazione.
- 
- Pappas et al. - Clinical practice guidelines for the management of candidiasis 2009 update by the IDSA - CID 2009 48;503-35
  - Pfaller et al. - Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited - Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria - Drug Resistance Updates 2011, doi:10.1016/j.drup.2011.01.004



# Comparazione fra coltura e PNA-FISH

periodo: 01.07.11 – 30.09.12

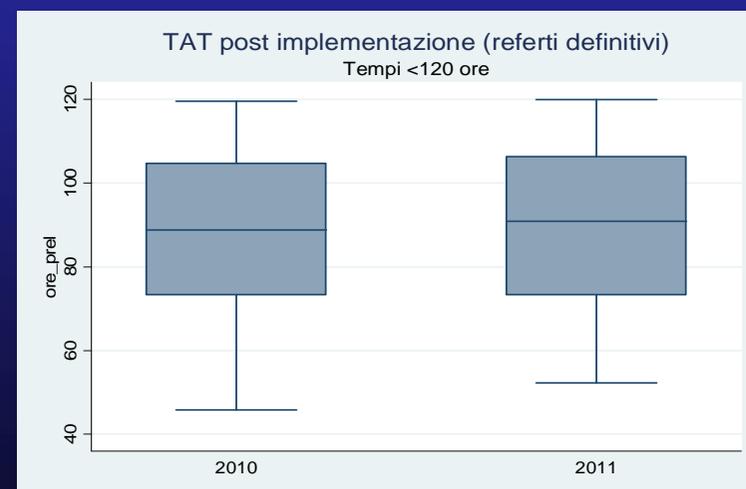
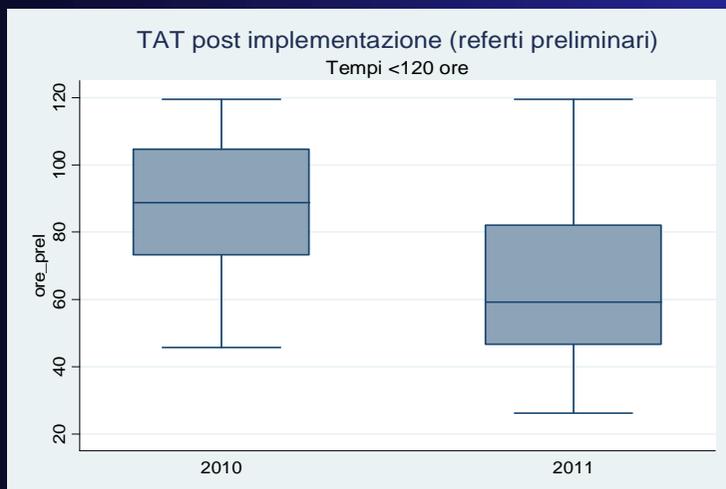
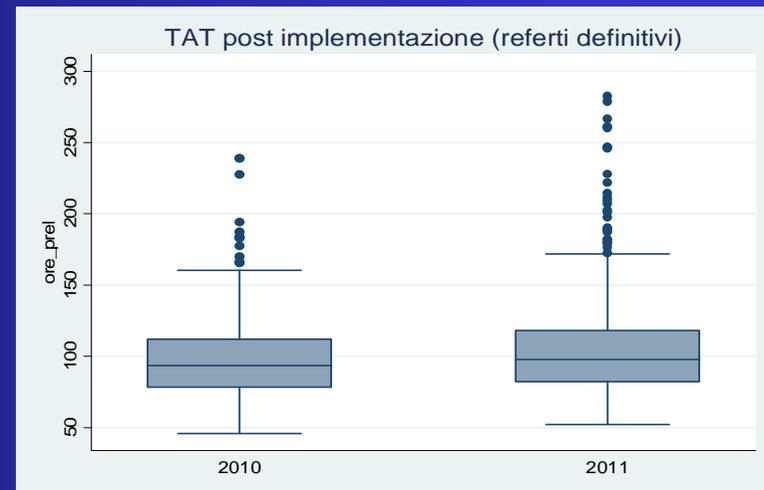
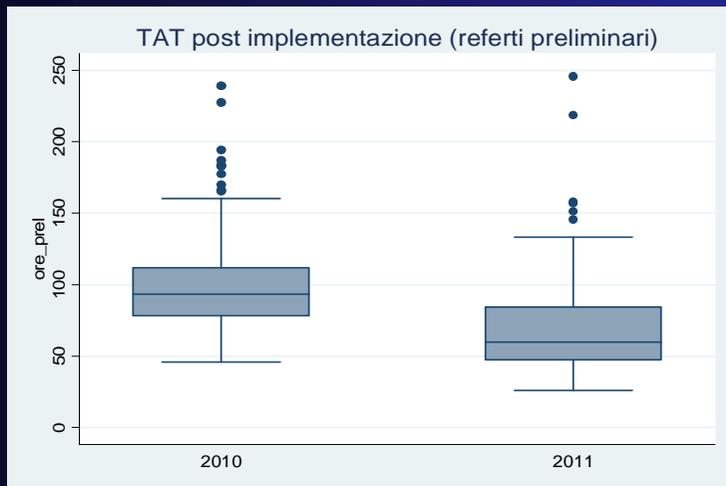
Identificazione biochimica/ enzimatica	TOTALI	PNA FISH				
		<i>C. albicans/ parapsilosis</i>		<i>C. glabrata/krusei</i>		Altre specie
<i>C. albicans</i>	45	44	0	0	0	1
<i>C. parapsilosis</i>	11	0	11	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	3	0	0	3	0	0
<i>C. krusei</i>	1	0	0	0	1	0
Altre specie	2	0	0	0	0	2
<b>TOTALI</b>	<b>62</b>	<b>44</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>



Forrest et al. Sustained Effect of Peptide Nucleic Acid Fluorescent in-situ Hybridization (PNA FISH) on Antimicrobial Utilization and Costs. Poster D787, ICAAC 2009

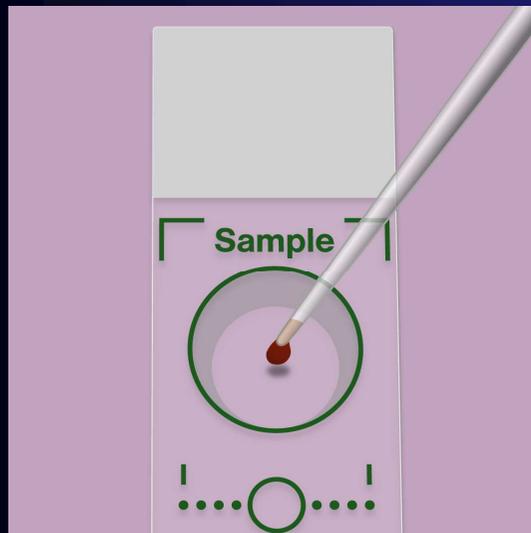
# PNA-FISH: impatto sul workflow del Laboratorio

- Le emocolture positive vengono processate al mattino dalle ore 08.00 e quindi durante tutta la giornata.
- Il personale tecnico prepara i vetrini che vengono valutati immediatamente dopo la positivizzazione.
- I risultati vengono immediatamente comunicati ai reparti; il personale tecnico predispone l'esecuzione della PNA-FISH sino alle ore 16.00.
- La manualità nella preparazione richiede 15 minuti.
- Stante la flessibilità del metodo, ogni Laboratorio può settare il proprio workflow sulla base delle proprie esigenze e possibilità.



# QuickFISH – Simple and Quick Procedure

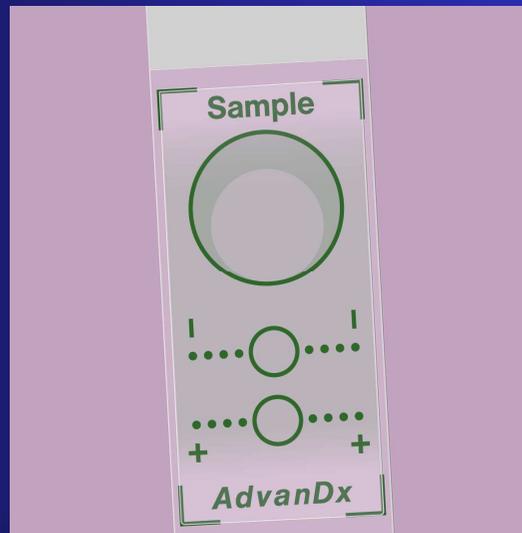
## Fix



5 min.

Fix 10  $\mu$  L of Blood Culture Samples to QuickFISH Slide

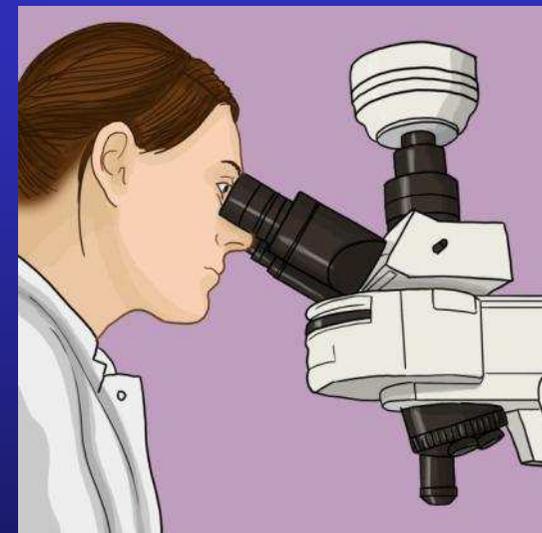
## Hybridize



15 min.

Add PNA Reagents. Hybridize for 15 Min. at 55°C

## Examine



View Results

Examine on Fluorescence Microscope

Turn Around Time = 20 min.  
Hands-On Time = 5 min.

# QuickFISH: cosa migliora

- Metodologia semplificata
  - Minori passaggi → fissazione/ibridazione → lettura dei risultati
  - Tempo di lavoro complessivo per il personale → 5 min.
  - Riduzione significativa del TAT → 20 min.
  - Validazione semplificata → controlli positivo e negativo sullo stesso vetrino.
- Maggiore impatto sulla clinica
  - La tempistica permette l'identificazione in tempi così ridotti da poter essere refertati contestualmente al Gram
  - Ulteriore impatto sulla descalation therapy

# Settembre 2011: si sperimenta la QuickFISH BC™

- Dall'ottobre 2011 al dicembre 2011 viene sperimentata presso il Laboratorio la QuickFISH per stafilococchi (*Staphylococcus* QuickFISH BC™, AdvanDx, USA - QFT): essa permette la distinzione in 20 minuti di stafilococco aureo da altri stafilococchi coagulasi negativi
- Scopo dello studio era la valutazione della performance del QFT comparandola con coagulasi diretta valutata a 4 ore e a 24 ore su diversi set di emocolture positive al Gram per cocci Gram+ in grappoli (GPCC).

## Comparison of the *Staphylococcus* QuickFISH BC Test with the Tube Coagulase Test Performed on Positive Blood Cultures for Evaluation and Application in a Clinical Routine Setting

E. Carretto,<sup>a</sup> M. Bardaro,<sup>a</sup> G. Russello,<sup>a</sup> M. Mirra,<sup>a</sup> C. Zuelli,<sup>a</sup> D. Barbarini<sup>b</sup>

Clinical Microbiology Laboratory, IRCCS Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy<sup>a</sup>; Virology and Microbiology Laboratory, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy<sup>b</sup>

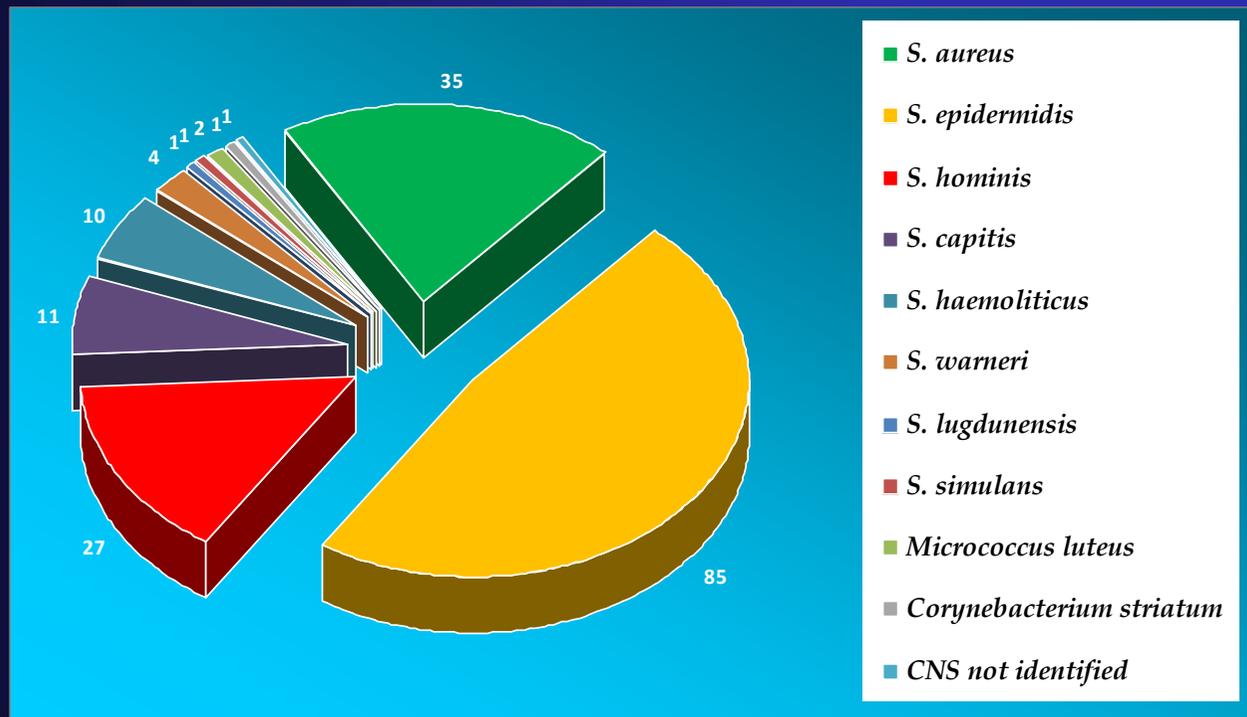
Many studies demonstrate that delayed proper therapy in bloodstream infections caused by *Staphylococcus aureus* increases the mortality rate, emphasizing the need to shorten the turnaround time for positive blood cultures. Different techniques are currently available, from phenotypic methods to more complex tests such as matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF), real-time PCR (RT-PCR), and fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes (PNA FISH). This study evaluated the performance of the *Staphylococcus* QuickFISH BC test (QFT), a novel FISH methodology, compared with the direct tube coagulase test (DTCT) on blood cultures exhibiting Gram-positive cocci in clusters. A total of 173 blood cultures collected from 128 different patients were analyzed using the DTCT, evaluated after both 4 and 24 h, and the QFT. A total of 179 isolates were identified using the Vitek2 system. Thirty-five out of 35 *Staphylococcus aureus* were correctly identified by the QFT (sensitivity = 100%), with a specificity of 100% (no green fluorescence was detected for strains different from *S. aureus*). The DTCT was positive after 4 h for 28 out of the 35 samples (sensitivity = 80%) and after 24 h for 31 out of the 35 samples (sensitivity = 88.57%). Among the remaining 144 isolates, one was then identified as *Corynebacterium striatum* and two as *Micrococcus luteus*. QFT identified 139 out of the 141 coagulase-negative staphylococci (CoNS) (sensitivity = 98.58%), showing again a specificity of 100% (no fluorescent red signals were detected for strains different from CoNS). We also discuss also the implementation process of this methodology in our setting, with particular emphasis on the workflow and the cost-effectiveness.

# Materiali e metodi

- Le emocolture sono state analizzate utilizzando il Bactec system™ (Becton Dickinson, USA). Nel periodo di studio (15.10.11 → 29.12.11) sono state analizzate tutte le emocolture che al Gram mostravano GPCC. Qualora entrambe i flaconi di un set fossero risultati positivi, veniva analizzato solo quello positivizzato per primo. Sono stati analizzati tutti i diversi set di uno stesso paziente.
- IL QFT è stato eseguito in accordo con i protocolli della ditta produttrice, dopo periodo di training. I vetrini sono stati valutati indipendentemente da diversi operatori.
- 3-5 gocce dell'emocoltura positiva sono stati contestualmente aggiunti a una provetta contenente 0.5 ml di plasma di coniglio con EDTA (BBL, Cockeysville, MD). Le provette sono state incubate in aria ambiente a 35°C e valutate una prima volta dopo 4 ore e quindi dopo 24 ore. Ogni formazione di coagulo è stata interpretata come risultato positivo.

# Risultati

- Sono state analizzate 173 emocolture di 128 differenti pazienti che erano risultate positive al Gram per GPCC. Sono stati identificati 179 isolati.



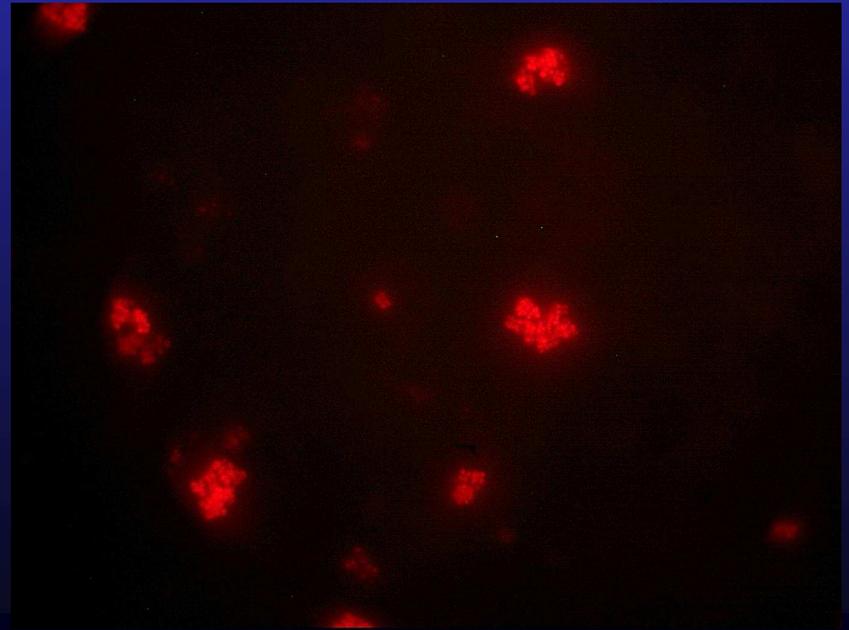
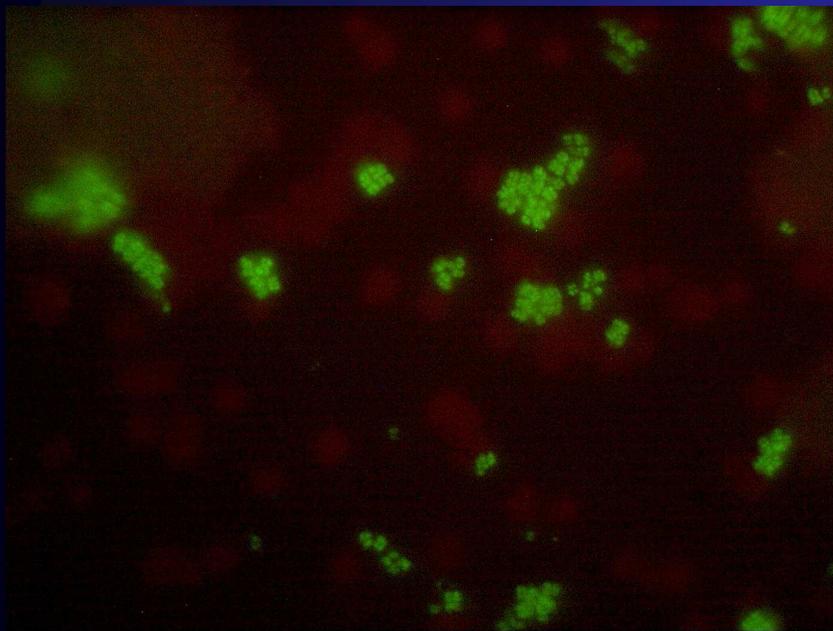
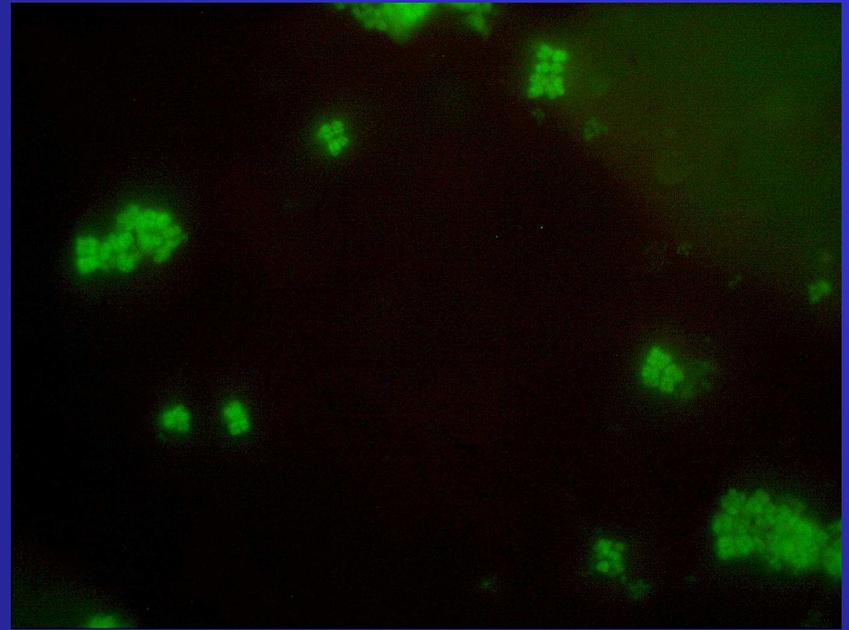
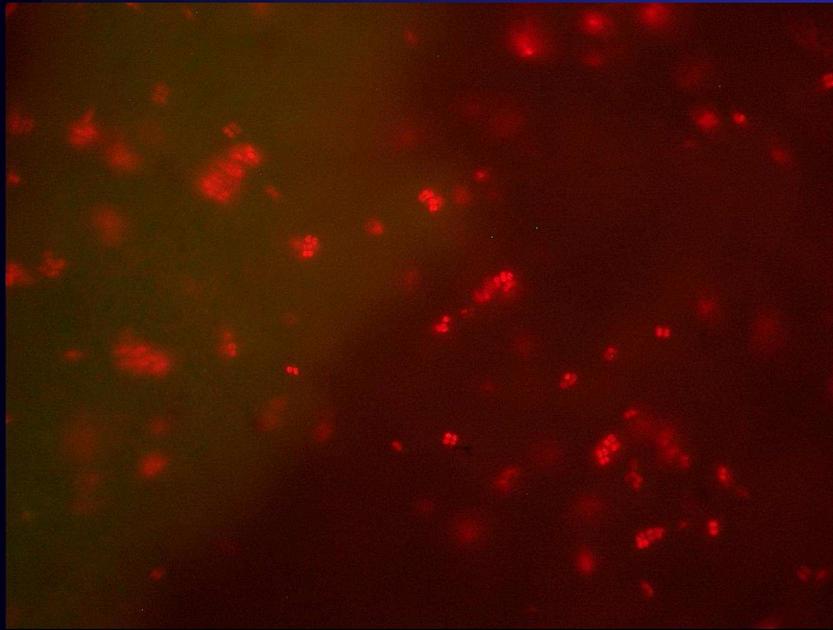


TABLE 1 Study synopsis<sup>a</sup>

Identification	No. of samples with result				
	Staphylococcus Quick FISH			DTCT	
	GF	RF	Negative	4 h	24 h
<i>S. aureus</i>	35 <sup>b</sup>	0	0	28	31
<i>S. epidermidis</i>	0	86 <sup>b,c</sup>	0	1 <sup>d</sup>	1 <sup>d</sup>
<i>S. hominis</i>	0	27 <sup>c</sup>	0	0	0
<i>S. capitis</i>	0	11	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	0	10	0	0	0
<i>S. warneri</i>	0	4	0	0	0
<i>S. lugdunensis</i>	0	1	0	0	0
<i>S. simulans</i>	0	0	1	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	2	0	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	0	0	1	0	0
None (not identified)	0	0	1	0	0

<sup>a</sup> GF, green fluorescence; RF, red fluorescence.

<sup>b</sup> One sample yielded *S. aureus* and *S. epidermidis*.

<sup>c</sup> Five samples yielded *S. epidermidis* and *S. hominis*.

<sup>d</sup> One sample yielding both *S. aureus* and *S. epidermidis* was positive by the DTCT at 4 h and 24 h.

TABLE 2 Comparison between the final IDs obtained by conventional techniques and QFT<sup>a</sup>

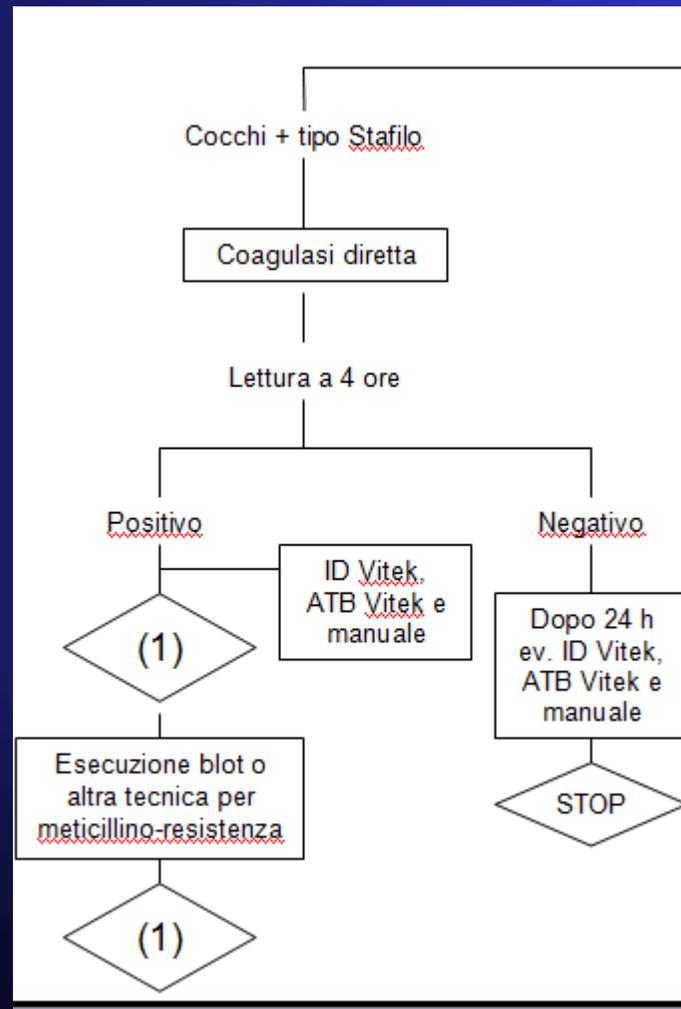
Organism(s)	No. of samples with result				Sensitivity of QFT (%)
	Standard ID (culture)	QFT			
		GF	RF	NF	
<i>S. aureus</i>	35	35			100
CoNS	141		139	2	98.56
Others	3			3	100
Total	179	35	139	5	

<sup>a</sup> GF, green fluorescence; RF, red fluorescence; NF, absence of fluorescence. Other strains are 2 *Micrococcus luteus* strains and 1 *Corynebacterium striatum* strain.

# Risultati e commenti

- QFT per stafilococchi si è dimostrato rapido, sensibile, specifico, ripetibile e di esecuzione assai facile. La sua performance nel discriminare fra stafilococco aureo e SCN è stata notevole, con una sensibilità del 100% e del 98,57%, rispettivamente.
- I cinque ceppi che hanno dato un risultato negativo (assenza di fluorescenza) erano 1 *Corynebacterium striatum* (erroneamente scambiato al Gram per GPCC), 2 *Micrococcus luteus* e 1 *Staphylococcus simulans* che sono noti per non ibridare con i probes usati per la QFT e un ceppo di stafilococco che non siamo stati in grado di identificare a livello di specie nemmeno utilizzando tecniche molecolari (specie di raro riscontro nella pratica clinica?).

# Contestualizzare il QFT anche in settings con scarse risorse

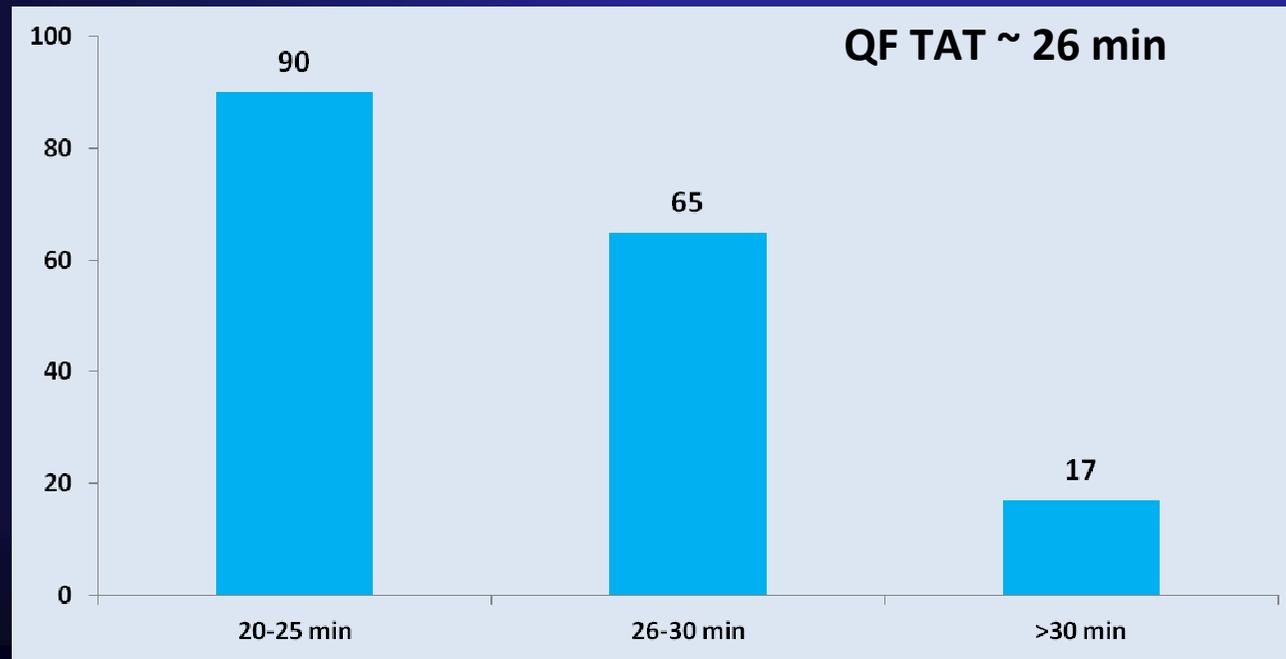


# Commenti

- Dall'analisi dei costi, anche in settings con scarse risorse economiche l'utilizzo del QFT per stafilococchi appare essere cost-effective quando utilizzato routinariamente per emocolture positive al Gram per cocci Gram positivi in grappolo che si sono positivizzate nel pomeriggio.
- In questo caso, i risultati della coagulasi diretta non sarebbero disponibili per il clinico se non il giorno dopo.
- La **progressiva implementazione delle tecniche in QuickFISH**, comunque, fanno postulare che nel breve-medio periodo questa tecnica possa sostituire la PNA-FISH tradizionale per tutti i microrganismi isolati da emocolture.
- Ad oggi, questa tecnologia, **che permette di refertare Gram e ID contemporaneamente**, può essere utilizzata per i Gram positivi; a breve verrà reso disponibile il kit per Gram negativi, mentre quello per lieviti verrà proposto in un prossimo futuro.

# TAT per QFT, TCT metodiche convenzionali

- *QuickFISH* ~26 min TAT; TCT ~ 4 hrs TAT per 80% di SA
  - *QuickFISH*: ~ 3½ ore più rapida su *S. aureus* ID rispetto al TCT (80%)
  - *QuickFISH*: ~ 24 ore più rapida su *S. aureus* ID rispetto al TCT (9%)
  - *QuickFISH*: ~ 2 giorni più rapida su *S. aureus* ID rispetto a metodiche standard (11%)
- *QuickFISH*: ~ 2 giorni più rapida su CoNS ID rispetto a metodiche standard



# The need for speed...



