



3° CONGRESSO NEWMICRO
Padenghe sul Garda (BS)
20 – 22 marzo 2013

.....THE NEED FOR SPEED: IL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E
LE URGENZE INFETTIVE

Organizzazione e ottimizzazione dell'attività nel laboratorio di virologia: l'esempio del CMV a Torino

CRISTINA COSTA

SC Microbiologia e Virologia U

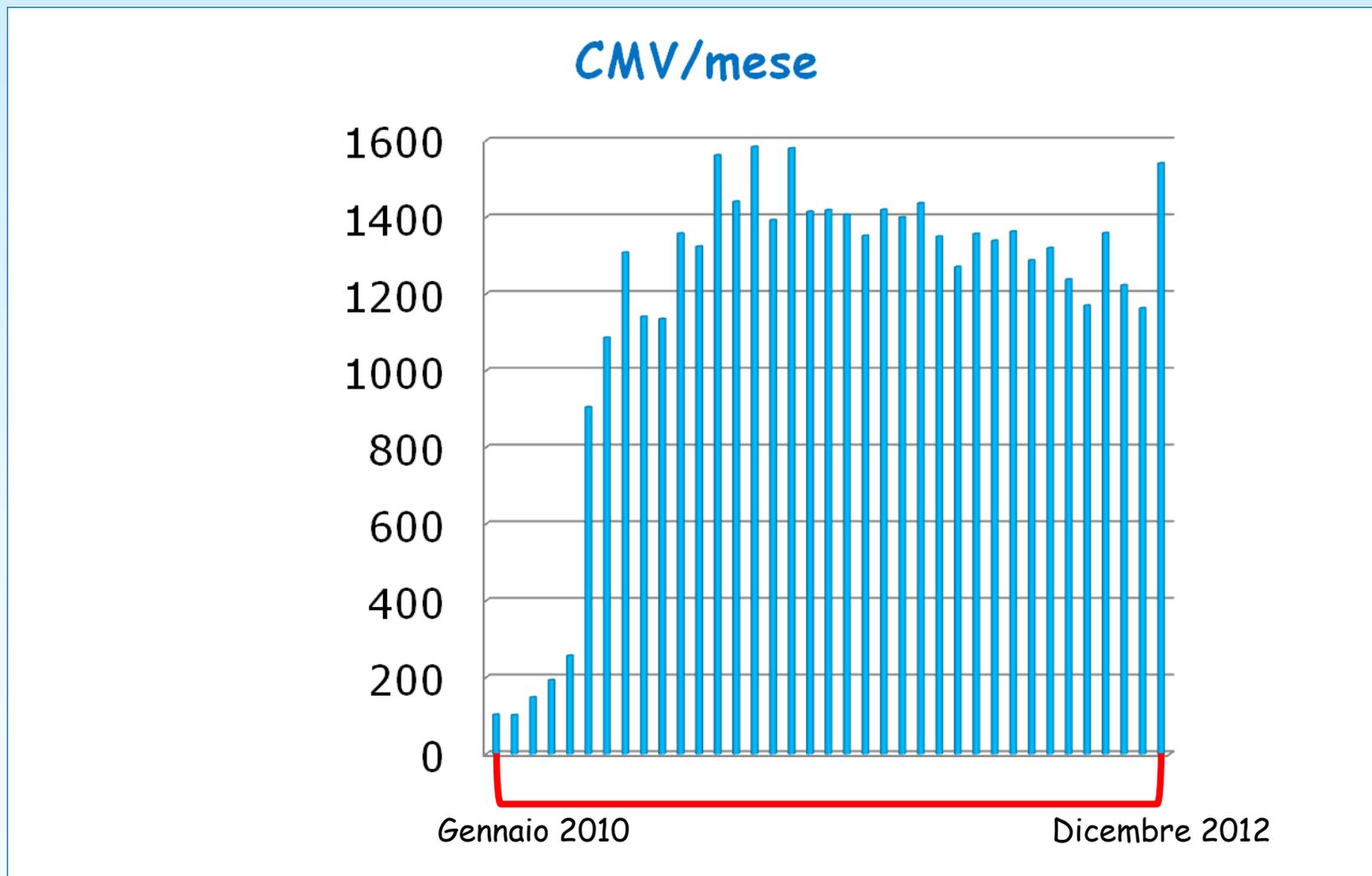
Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino

Virologia di Torino: 2004-2013

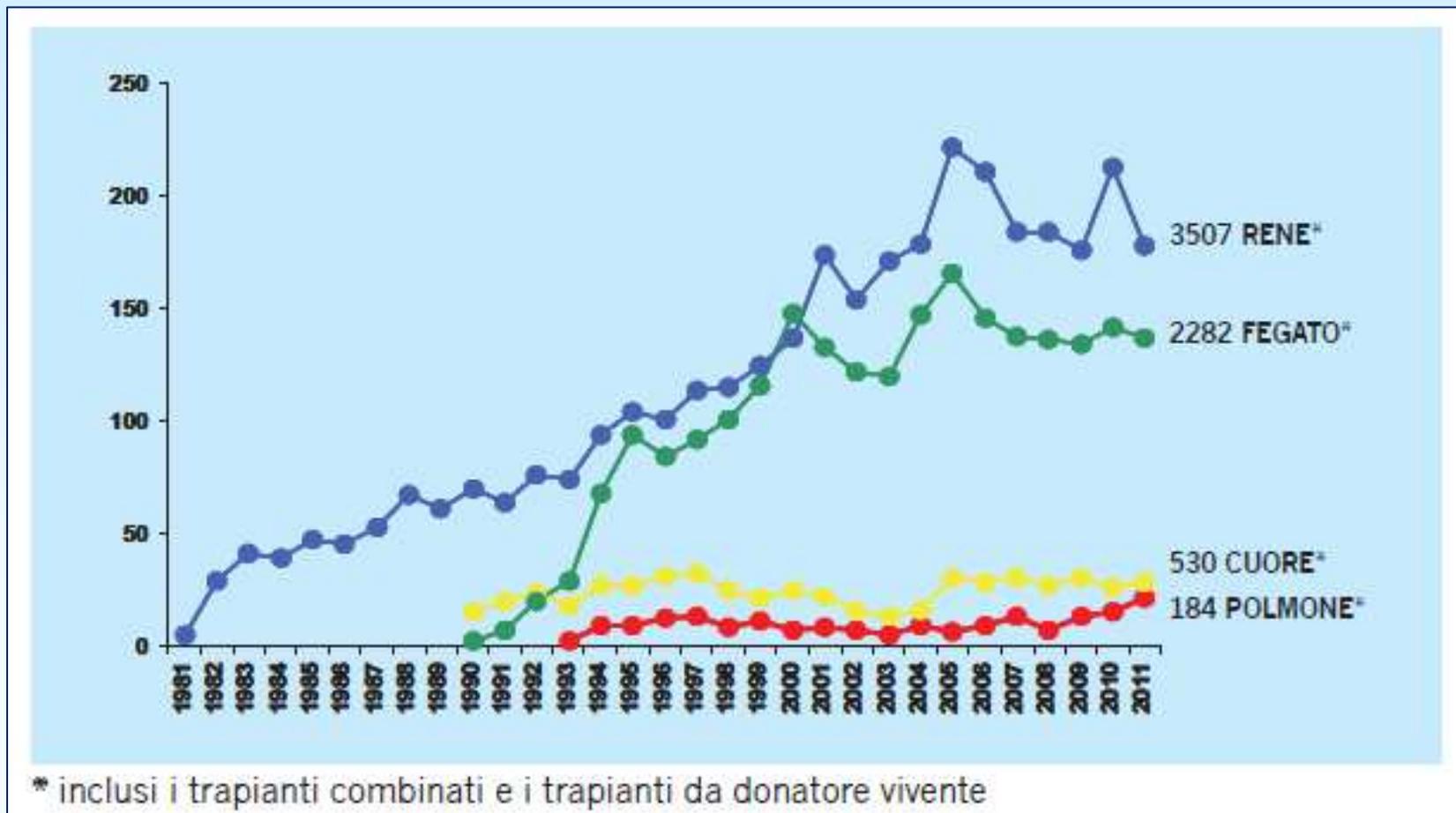
- Volumi di attività
- Metodi diagnostici
- **Risorse umane**
- Sistema gestione qualità e certificazione



Volumi di attività: 2010-2013

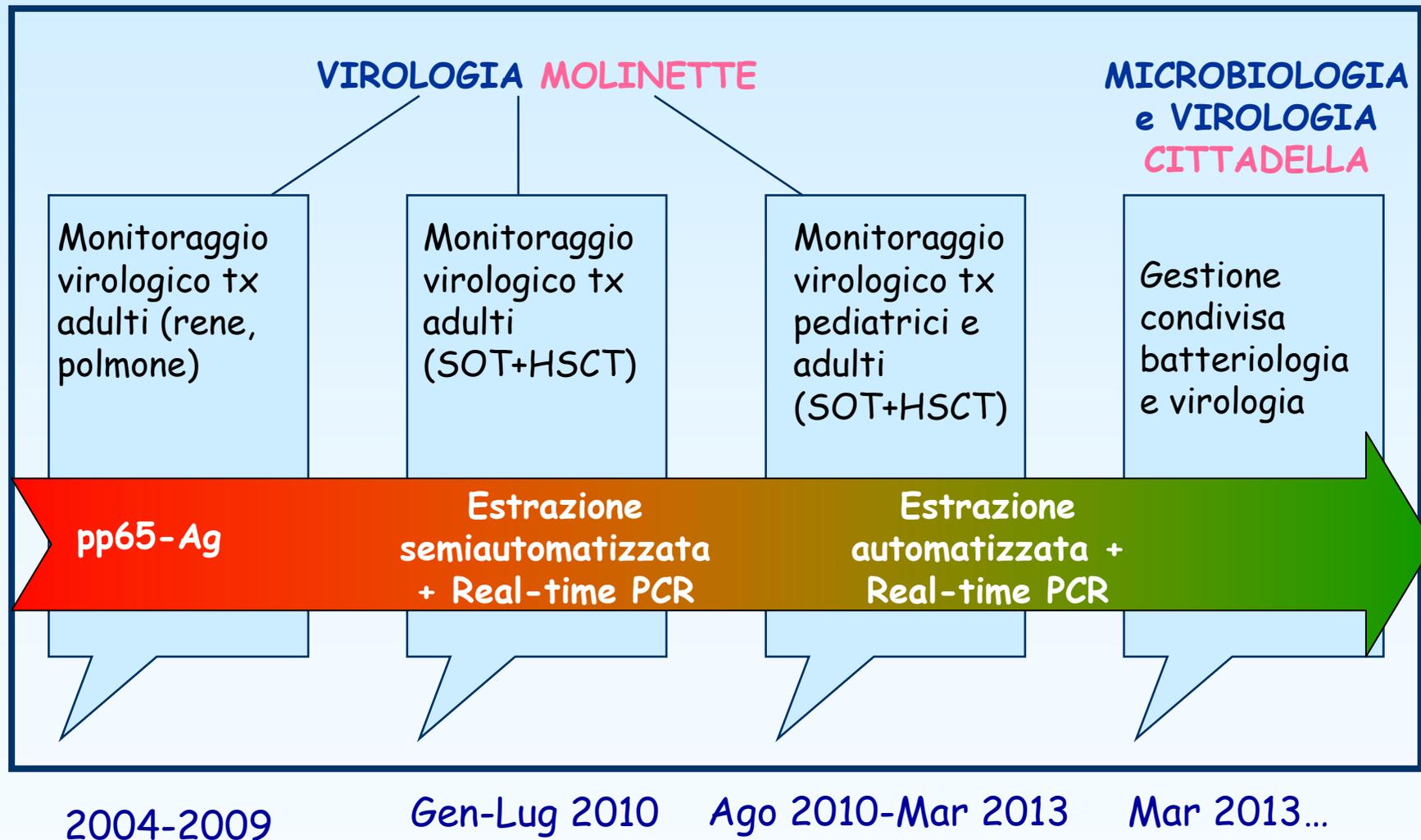


Centro Regionale Trapianti Piemonte e Valle d'Aosta



Fonte CRT: Dati di attività

Percorso evolutivo virologia e CMV di Torino: 2004-2013



Sistema gestione qualità e certificazione

- **EFFICACIA:** risultato affidabile, tempistica adeguata
- **EFFICIENZA:** ottimizzazione delle risorse umane, strumentali ed economiche
- **TRACCIABILITA':** paziente, campione, test, reagenti, controlli, strumento, operatori



**QUALITA' =
SODDISFAZIONE
DELL'UTENTE**

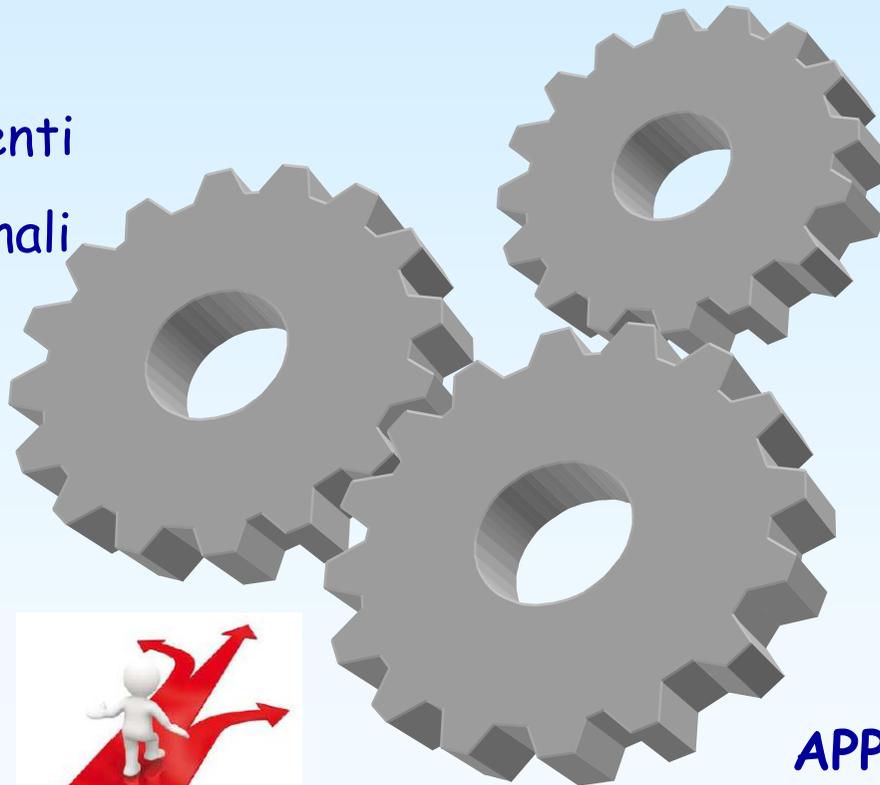
Ottimizzazione e razionalizzazione

AUTOMAZIONE + INFORMATIZZAZIONE

LIS aziendale

Software strumenti

Software gestionali

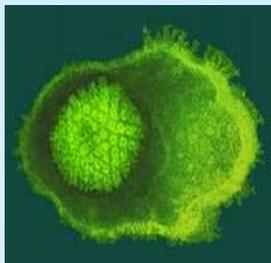
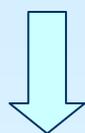


APPROPRIATEZZA

Percorsi diagnostici
"patient tailored"

CMV e trapianti

LATENZA
RIATTIVAZIONE



- * INFEZIONE: positività test virologici in assenza di sintomi
- * MALATTIA: infezione sintomatica

FATTORI DI RISCHIO

MATCHING SIEROLOGICO D/R
(high risk D+/R-)

LIVELLO DI
IMMUNOSOPPRESSIONE

Table 1. Incidence of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation⁴

| Organ | Infection | Disease |
|-----------------------------|-----------|---------|
| Kidney | 8%–32% | 8% |
| Heart | 9%–35% | 25% |
| Liver | 22%–29% | 29% |
| Lung or heart/lung | 39%–41% | 39% |
| Pancreas or kidney/pancreas | 50% | 50% |

Strategie antivirali e monitoraggio CMV a Torino

Pazienti high risk (D+/R-)

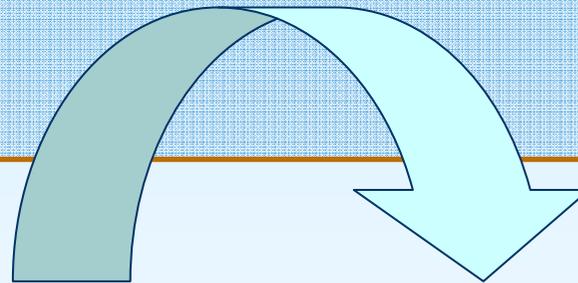
Infezione

Malattia

PROFILASSI ANTIVIRALE

TERAPIA PRE-EMPTIVE

TERAPIA ANTIVIRALE



MONITORAGGIO VIROLOGICO

DNAemia su sangue intero

1/sett fino a 3 mesi

1/mese fino a 12 mesi

se risultato positivo 2/sett

MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO

risposta T CMV-specifica

mediante Elispot

a 1, 3, 6, 12 mesi



LABORATORIO
Analisi clinico-strumentale



Ricezione lista di lavoro

Analisi risultati
Trasmissione al LIS



Ricezione files di estrazione e assay setup
Trasmissione setup ABI



AMPLIFICAZIONE

Provetta madre
Lettura bar-code
Caricamento batch
Estrazione automatica



SAMPLE PREPARATION

ASSAY SET-UP

Trasferimento automatico estratti
Allestimento automatico test in base a lista lavoro

Gestione quotidiana CMV



Gestione settimanale settore Biologia Molecolare

| | PIASTRA 1 | PIASTRA 2 | PIASTRA 3 |
|-------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| LUNEDI' | CMV | EBV (SG venerdì + campioni vari) | BK |
| MARTEDI' | CMV | VZV, HHV8, HSV-1 e 2 | HHV6, Parvo B19, Adeno |
| MERCOLEDI' | CMV (SG + campioni vari) | EBV (SG lunedì + martedì) | HHV7 |
| GIOVEDI' | CMV | JCV | RT+Entero |
| VENERDI' | CMV | EBV (SG mercoledì + giovedì) | Quantificazione su campioni tess. |

Risultato quantitativo: CMV, EBV, BKV, Parvo B19, Adeno, HSV1, HHV6, Entero

Risultato preliminare qualitativo: VZV, HSV2, JCV, HHV7, HHV8

Pannello virus respiratori in mutliplex

Confronto di due sistemi (estrazione + NAT) per la quantificazione di CMV-DNA su sangue intero in pazienti trapiantati

SISTEMA 1

estrazione automatizzata (Qiasymphony) + artus® CMV QS-RGQ kit (Rotor-Gene Q, Qiagen)



SISTEMA 2

estrazione semiautomatica EasyMag (Biomerieux) + Q-CMV Real Time Complete kit (Nanogen, 7500 Real-time PCR system, ABI)

Campioni - Caratteristiche dei sistemi

| | |
|-------------------------------|--|
| 189 campioni di sangue intero | 156 pazienti (90 SOT; 66HSCT) I anno post-trapianto |
| QCMD 2012 proficiency panel | 12 campioni |

| FEATURES | SYSTEM 1 | SYSTEM 2 |
|---|---|---------------------------------------|
| Target | MIE | MIE |
| Extracted DNA volume (μ l) | 20 | 5 |
| Final volume (μ l) in assay | 50 | 25 |
| N _o , type of quantification standards | 4, plasmid | 4, plasmid |
| Analytical sensitivity | 164,55 copies/ml | 158 copies/ml |
| Specificity | 100% | 90% |
| Linear range | $1 \times 10^3 - 5 \times 10^7$ copies/ml | 20- 1×10^6 - copies/reaction |

Risultati mediante i due sistemi

| | SISTEMA 1 / POS | SISTEMA 1 / NEG |
|------------------------|------------------------|------------------------|
| SISTEMA 2 / POS | 90 (47.6%) | 9 (4.8%) |
| SISTEMA 2 / NEG | 28 (14.8%) | 62 (32.8%) |

Concordanza totale: 80.4%

Concordemente positivi: media \pm DS

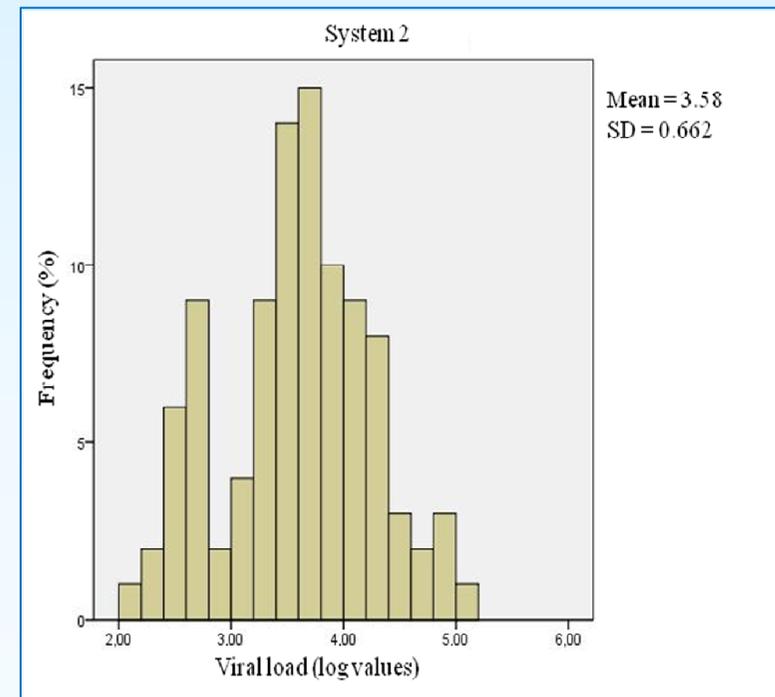
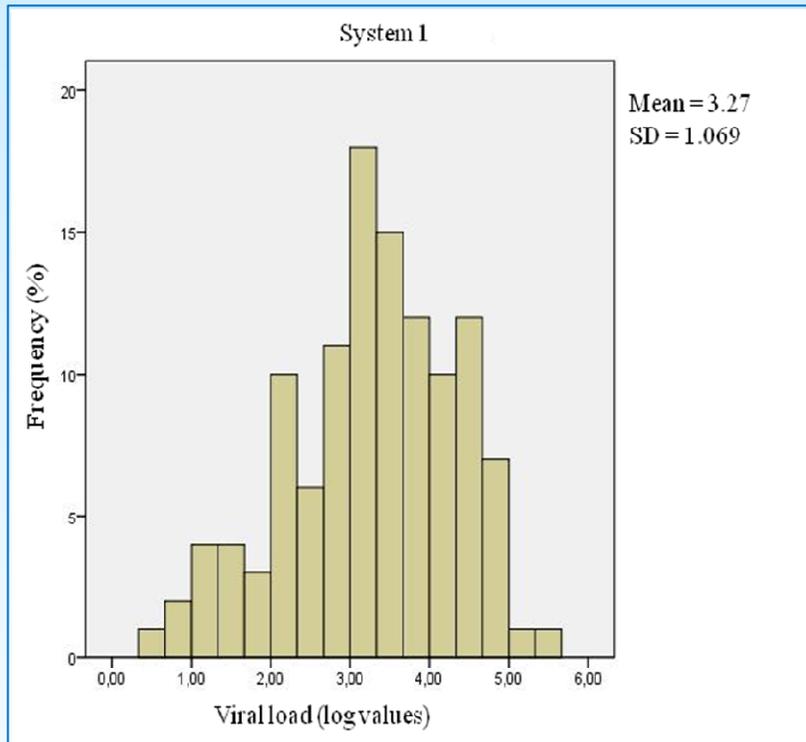
SISTEMA 1 **4.25 \pm 4.58 \log_{10} copie/ml**

SISTEMA 2 **4.06 \pm 4.29 \log_{10} copie/ml**

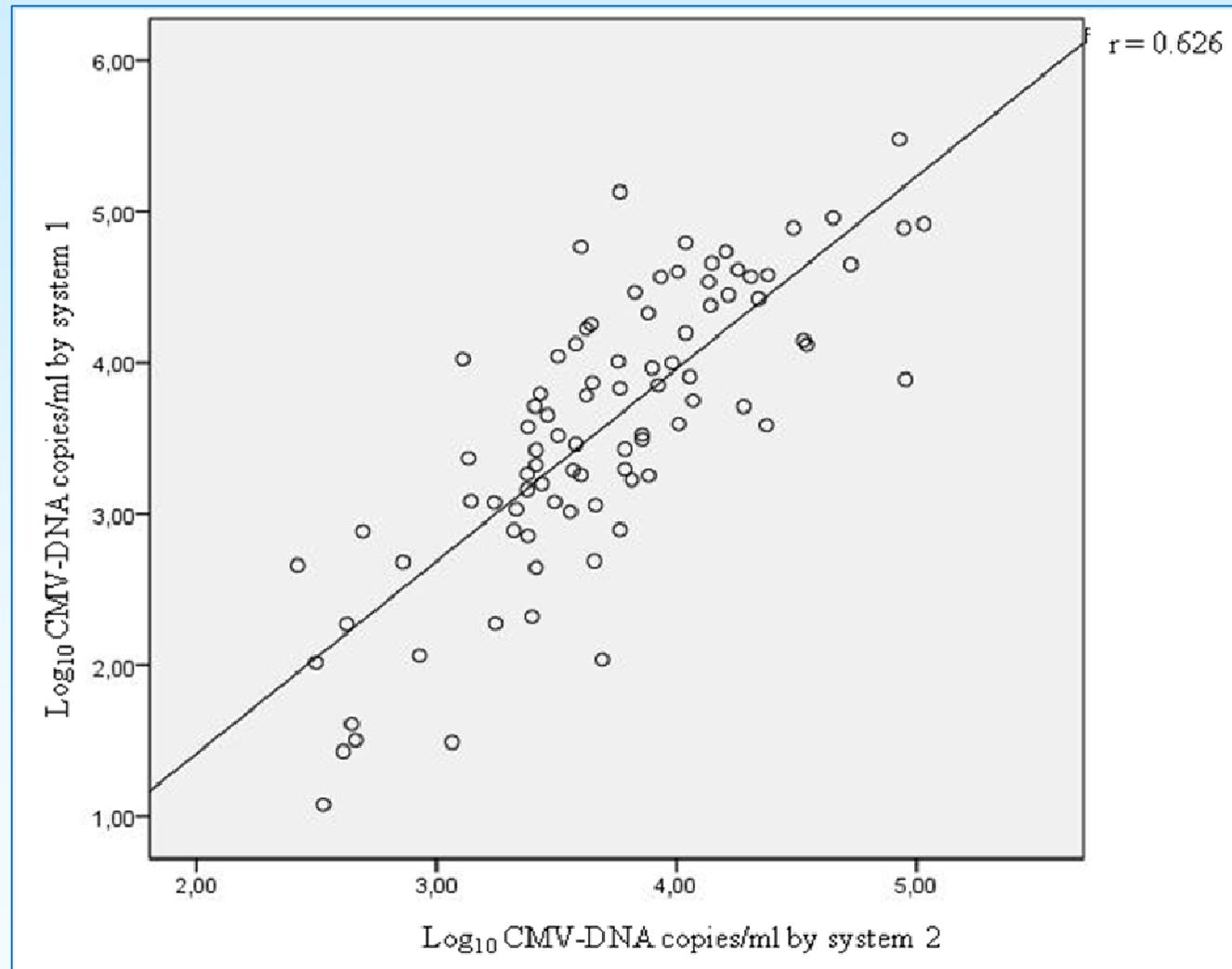
Differenza 0.19 \log_{10} copie/ml

Qualitativamente discordanti: carica virale media $\leq 3 \log_{10}$ copie/ml

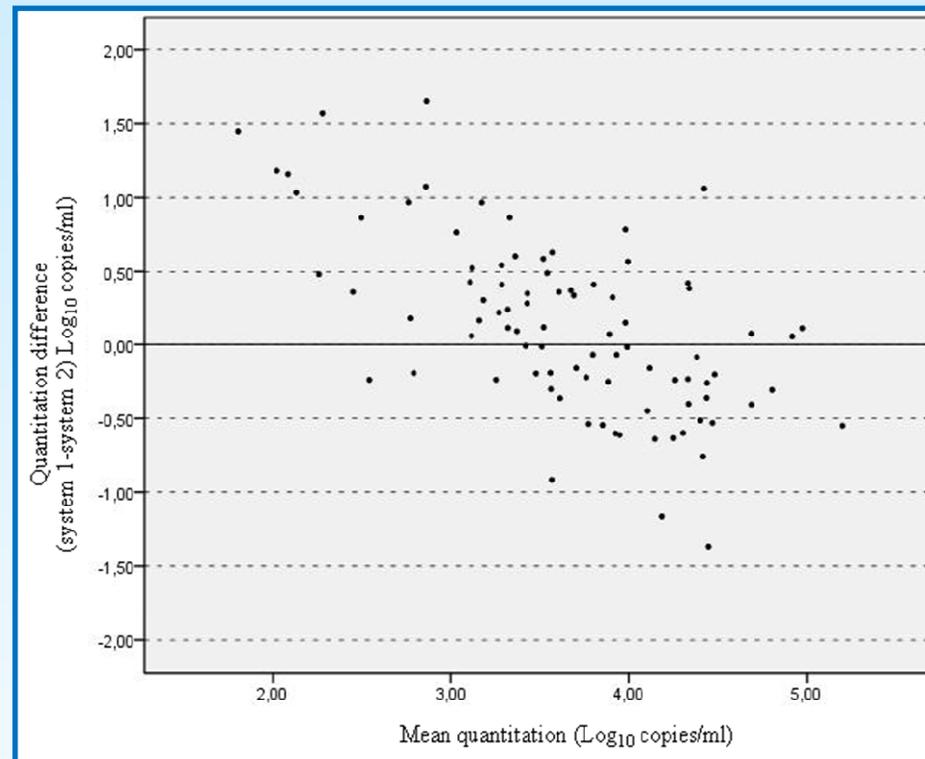
Distribuzione delle cariche virali con i due sistemi



Regressione lineare



Analisi di Bland-Altman (differenze medie di quantificazione)



Differenze tra i due sistemi entro $\pm 1 \log_{10}$ copie/ml dei valori log medi nell'88.9% dei campioni

Risultati e variabilità dei due sistemi per il QCMD 2012 proficiency panel

| Samples | System 1 results \log_{10} (copies/ml) | System 2 results \log_{10} (copies/ml) | QCMD results \log_{10} (copies/ml) | Difference system 1 / QCMD \log_{10} (copies/ml) | Difference system 2 / QCMD \log_{10} (copies/ml) |
|----------|--|--|---|---|---|
| CMV12-01 | 4.36 | 4.46 | 4.30 | 0.06 | 0.16 |
| CMV12-02 | 3.89 | 3.86 | 3.74 | 0.15 | 0.12 |
| CMV12-03 | 2.30 | 2.14 | 2.24 | 0.06 | -0.10 |
| CMV12-04 | 1.43 | 1.47 | 2.07 | -0.64 | -0.60 |
| CMV12-05 | 2.99 | 3.40 | 2.90 | 0.09 | 0.50 |
| CMV12-06 | 3.33 | 3.51 | 3.30 | 0.03 | 0.21 |
| CMV12-07 | 3.50 | 3.50 | 3.32 | 0.18 | 0.18 |
| CMV12-08 | negative | negative | negative | / | / |
| CMV12-09 | 3.62 | 3.82 | 3.67 | -0.05 | 0.15 |
| CMV12-10 | 2.88 | 2.69 | 2.73 | 0.15 | -0.04 |

Per i campioni positivi la differenza era $<0.7 \log_{10}$ copie/ml per entrambi i sistemi
($\Delta \log_{10}$ medio: 0.1566 per sistema 1 e 0.2288 per sistema 2)

Impatto clinico

Cut-off per guidare terapia pre-emptive (linee guida SIV)

300.000 copie/ml in SOT
10000 copie/ in HSCT



TRAPIANTO ORGANO SOLIDO:

1 paziente trattato con sistema 1 e non con sistema 2

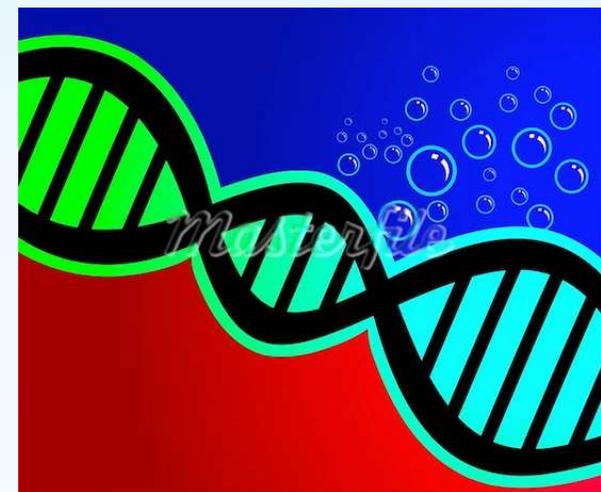
TRAPIANTO CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE:

5 pazienti trattati con sistema 1 e non con sistema 2

1 paziente trattato con sistema 2 e non con sistema 1

Conclusioni

- Entrambi i sistemi affidabili con concordanza totale 80.4%
- Identificazione precoce di pazienti a rischio (distribuzione di frequenza delle cariche virali)
- Livello di automazione, indispensabile nei laboratori con elevata routine
- Studi di confronto solo sistemi di amplificazione
- Studi di cinetica della carica virale



Grazie

Azienda Ospedaliera
Città della Salute e della Scienza di Torino
SC Microbiologia e Virologia
(Prof.ssa Rossana Cavallo)

