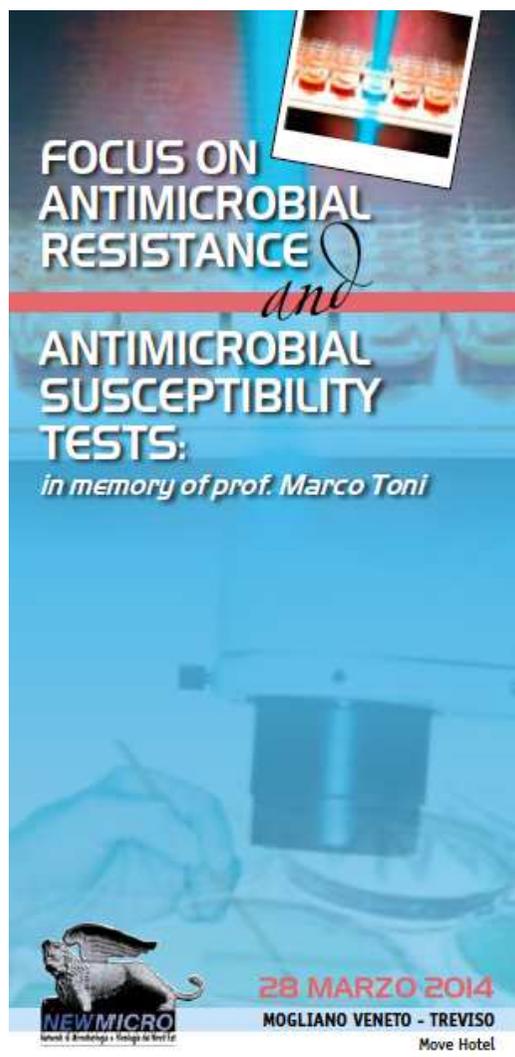


La gestione dei test di sensibilità nell'organizzazione del laboratorio



Gian Maria Rossolini

Dip. Medicina Sperimentale e Clinica
Università di Firenze

Dip. Biotecnologie Mediche
Università di Siena

SODc Microbiologia e Virologia
A.O.U. Careggi, Firenze



I saggi di sensibilità nel laboratorio di Microbiologia Clinica

- ✧ **≈80 - 90% delle comunicazioni con l'utenza (clinici / pazienti / direzione aziendale / farmacia / ARS-Regione)**
- ✧ **≈10 - 20% del budget (variabilità a seconda della tipologia di laboratorio)**
- ✧ **Coinvolgimento del 100% del personale dirigente e tecnico**

Ruolo dei saggi di sensibilità nel laboratorio di Microbiologia Clinica

- ✧ **Scelta della terapia antibiotica**
- ✧ **Epidemiologia delle resistenze (locale/nazionale) e loro evoluzione**
- ✧ **Sorveglianza mirata ad interventi di *infection control* (ceppi MDR/XDR ad alto rischio epidemico)**

I test di sensibilità nel laboratorio di Microbiologia Clinica

**Servono davvero per la
scelta della terapia?**

Evidence for clinical implications of AST data

REVIEW ARTICLE

CID 2007

A Systematic Review of the Methods Used to Assess the Association between Appropriate Antibiotic Therapy and Mortality in Bacteremic Patients

Jessina C. McGregor,¹ Shayna E. I
Thomas P. Lodise, Jr.,⁵ Ram R. Mil

	No. (%) of studies ^a
Appropriate antibiotic therapy definition characteristic	
Accounted for the in vitro antibiotic susceptibility test results	40 (87)
Specified at what point during the patient's admission that antibiotic therapy was assessed	37 (80)
Assessed empiric and/or definitive therapy ^b	34 (74)
Recorded the time at which antibiotic susceptibility test results became available	11 (24)
Included route of administration	17 (37)
Included dosing of antibiotic	16 (35)
Measured time to appropriate therapy	2 (4)

Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy

Alasdair P. MacGowan^{1,2*} on behalf of the BSAC Working Parties on Resistance Surveillance

Recent significant improvement in evidence supporting the clinical predictive value of phenotypic susceptibility testing

Appropriate therapy associated with improved outcomes in serious infections (e. g. BSI, pneumonia), community infections (e. g. UTI), and for specific pathogens (e. g. ESBL, *Pseudomonas*)

Central role of AST in dictating antimicrobial therapy and optimizing outcomes

La gestione dei saggi di sensibilità nell'organizzazione del laboratorio

✧ **Accuratezza**

✧ **Completezza delle informazioni**

✧ **Rapidità dei risultati (TTR)**

Staphylococcus spp.

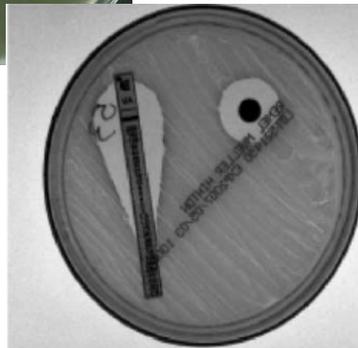
Glycopeptides ¹	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
						1. Glycopeptide MICs are method dependent and should be determined by broth microdilution (reference ISO 20776). <i>S. aureus</i> with vancomycin MIC values of 2 mg/L are on the border of the wild type MIC distribution and there may be an impaired clinical response. The resistant breakpoint has been reduced to 2 mg/L to avoid reporting "GISA" isolates intermediate as serious. Infections with "GISA" isolates are not treatable with increased doses of vancomycin or telicoplanin.
Telicoplanin, <i>S. aureus</i>	2	2		Note ^A	Note ^A	A. Disk diffusion is unreliable and cannot distinguish between wild type isolates and those with non-vanA-mediated resistance.
Telicoplanin, Coagulase-negative staphylococci	4	4		Note ^A	Note ^A	
Telavancin, MRSA	1	1		Note ^A	Note ^A	
Vancomycin, <i>S. aureus</i>	2	2		Note ^A	Note ^A	
Vancomycin, Coagulase-negative staphylococci	4	4		Note ^A	Note ^A	

Disc-diffusion



L'accuratezza può variare in base a:

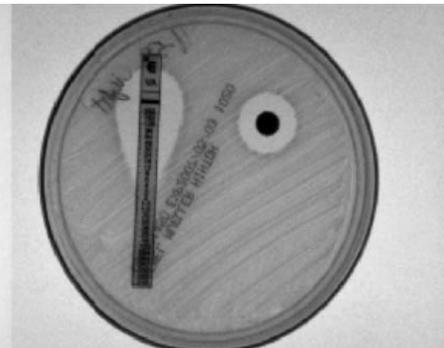
- tipo di molecola
- terreno di coltura
- metodica di saggio



Vancomycin MIC, 0.5 µg/mL
Zone diameter, 17 mm



Vancomycin MIC, 2 µg/mL
Zone diameter, 17 mm



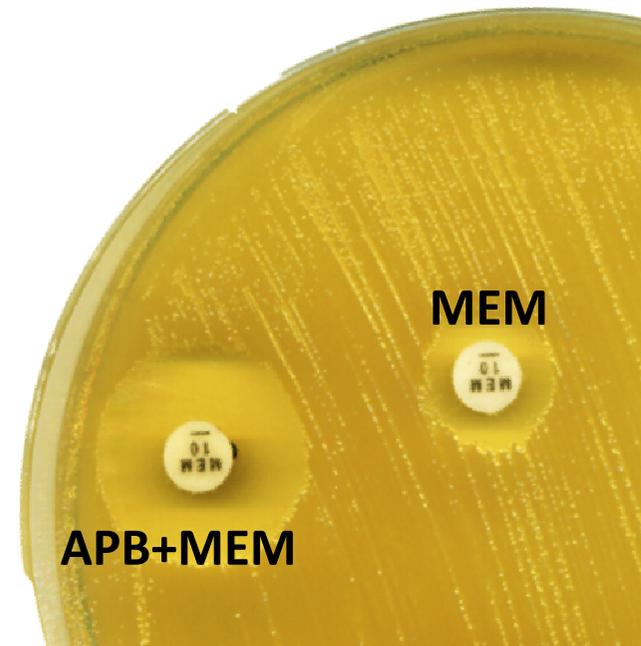
Vancomycin MIC, 8 µg/mL
Zone diameter, 17 mm



iffusion

XDR *Klebsiella pneumoniae* da cIAI

Antibiotico	MIC mg/L(S/I/R)
Amoxi/Clav	>16 R
Pip/Tazo	>64 R
Ceftazidime	>32 R
Cefepime	>32 R
Ertapenem	>4 R
Imipenem	>8 R
Meropenem	>8 R
Amikacina	>32 R
Gentamicina	4 I
Ciprofloxacina	>2 R
Tigeciclina	4 R
Colistina	≤0.5 S
SXT	>160 R



produttore di KPC

Saggiata con sistema automatico

XDR *Klebsiella pneumoniae* da cIAI

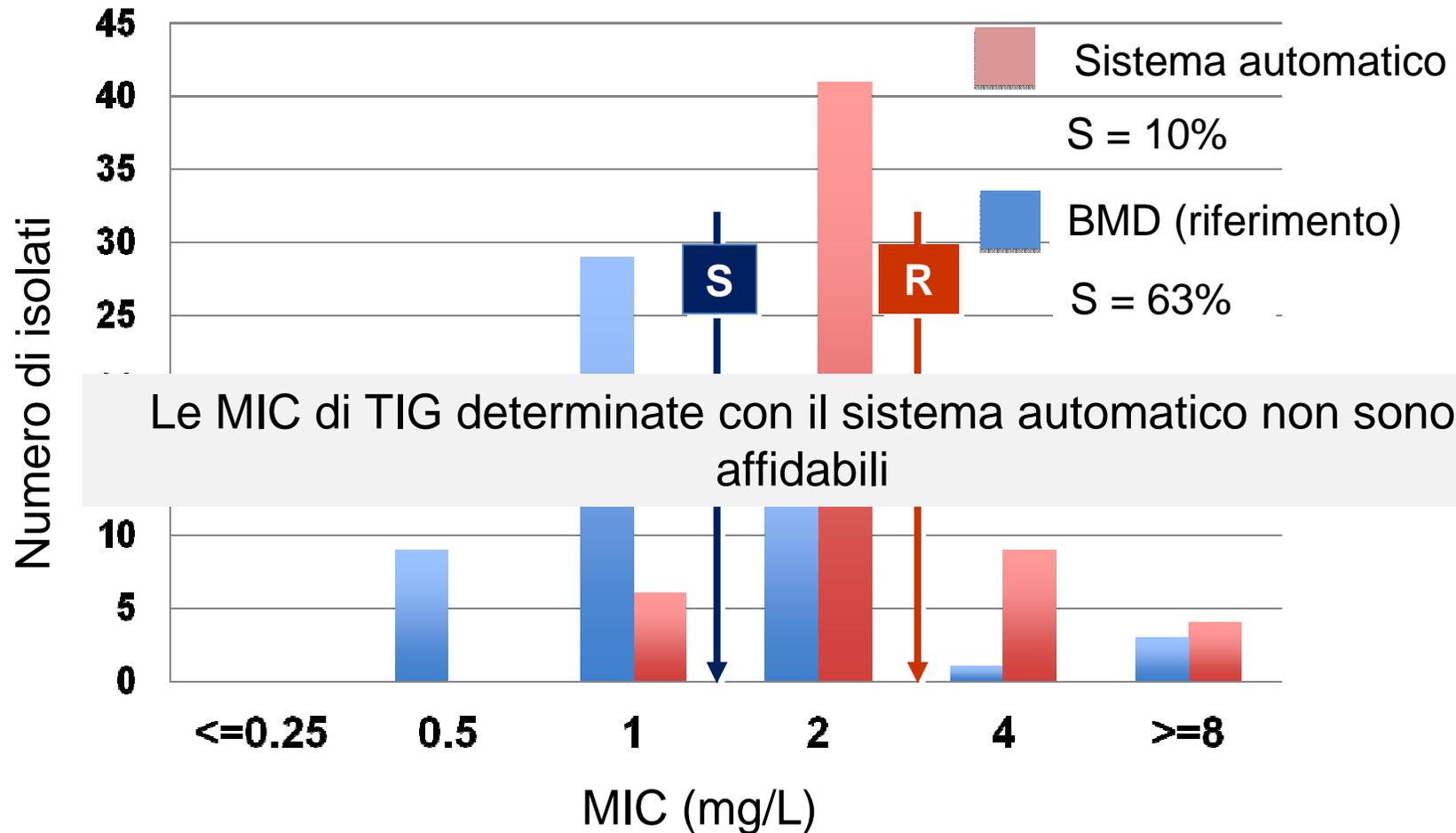
Antibiotico	MIC mg/L(S/I/R)
Amoxi/Clav	>16 R
Pip/Tazo	>64 R
Ceftazidime	>32 R
Cefepime	>32 R
Ertapenem	>4 R
Imipenem	>8 R
Meropenem	>8 R
Amikacina	>32 R
Gentamicina	4 I
Ciprofloxacina	>2 R
Tigeciclina	4 R
Colistina	≤0.5 S
SXT	>160 R

Sistema automatico

Antibiotico	MIC mg/L(S/I/R)
Amp/Sulb	>32 R
Pip/Tazo	>128 R
Ceftazidime	>128 R
Cefepime	>64 R
Ertapenem	>4 R
Imipenem	>16 R
Meropenem	>64 R
Amikacina	>16 R
Gentamicina	2 S
Ciprofloxacina	>2 R
Tigeciclina	1 S
Colistina	≤0.5 S
SXT	>160 R

Microdiluzione in brodo
(sistema di riferimento)

Tigeciclina e *K. pneumoniae* KPC+



Comparison of Polymyxin B, Tigecycline, Cefepime, and Meropenem
MICs for KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* by Broth
Microdilution, Vitek 2, and Etest[∇]

Asma Lat,^{1*} Sarah A. Clock,² Fann Wu,^{1,2} Susan Whittier,¹ Phyllis Della-Latta,^{1,2} Kathy Fauntleroy,^{1,3}
Stephen G. Jenkins,^{1,3} Lisa Saiman,^{1,2} and Christine J. Kubin^{1,2}

- ◆ Etest e Vitek2 vs. BMD di riferimento con 48 *K. pneumoniae* KPC+
- ◆ Etest sovrastima leggermente le MIC di TIG (10% di *minor errors*)
- ◆ Vitek2 **sovrastima le MIC di TIG** (10% di *Major Errors*, 25% di *minor Errors*) e **sottostima le MIC di meropenem e cefepime** (27% e 67% di *Very Major Errors*, rispettivamente)

Comparative Evaluation of Tigecycline Susceptibility Testing Methods for Expanded-Spectrum Cephalosporin- and Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens

Olympia Zarkotou,^a Spyros Pournaras,^b George Altouvas,^a Vassiliki Pitiriga,^c Maria Tziraki,^a Vassiliki Mamali,^a Katerina Themeli-Digalaki,^a and Athanassios Tsakris^c

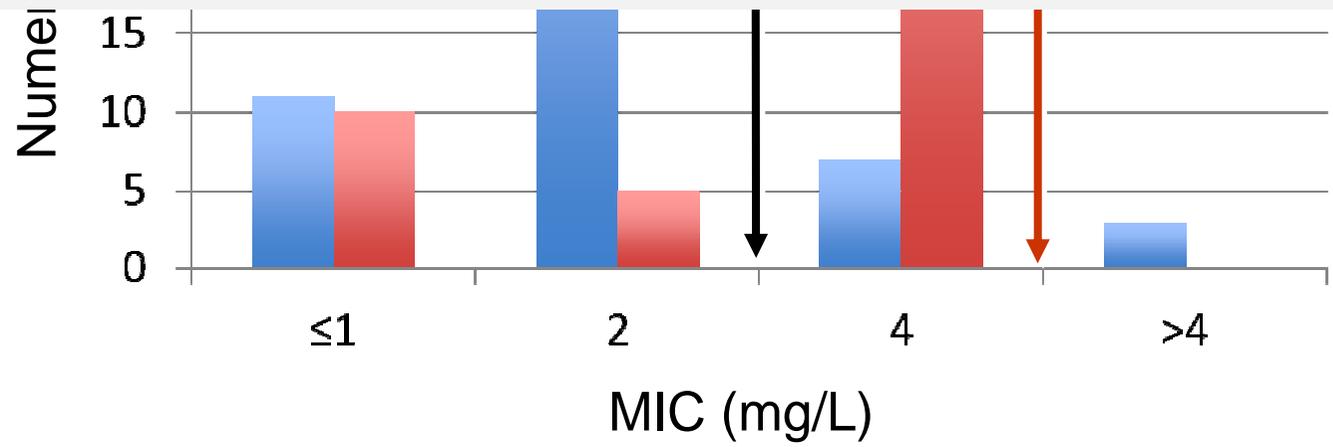
- ◆ **Etest e Vitek2 vs. BMD di riferimento con 241 Gram-negativi MDR (ESBL, CRE, CRA)**
- ◆ **Etest sovrastima leggermente la MIC (1% di *Major errors*, 34% di *minor Errors* con i CRE)**
- ◆ **Vitek2 sovrastima la MIC (26% di *Major Errors* e 47% di *minor Errors* con i CRE)**

I risultati per tigeciclina ottenuti con il sistema automatico richiedono una conferma con altra metodica

Gentamicina e *K. pneumoniae* KPC+



Le MIC di GEN determinate con sistema automatico non sono affidabili



La gestione dei test di sensibilità nell'organizzazione del laboratorio

✧ Accuratezza

✧ **Completezza delle informazioni**

✧ Rapidità dei risultati (TTR)

Serve la MIC?

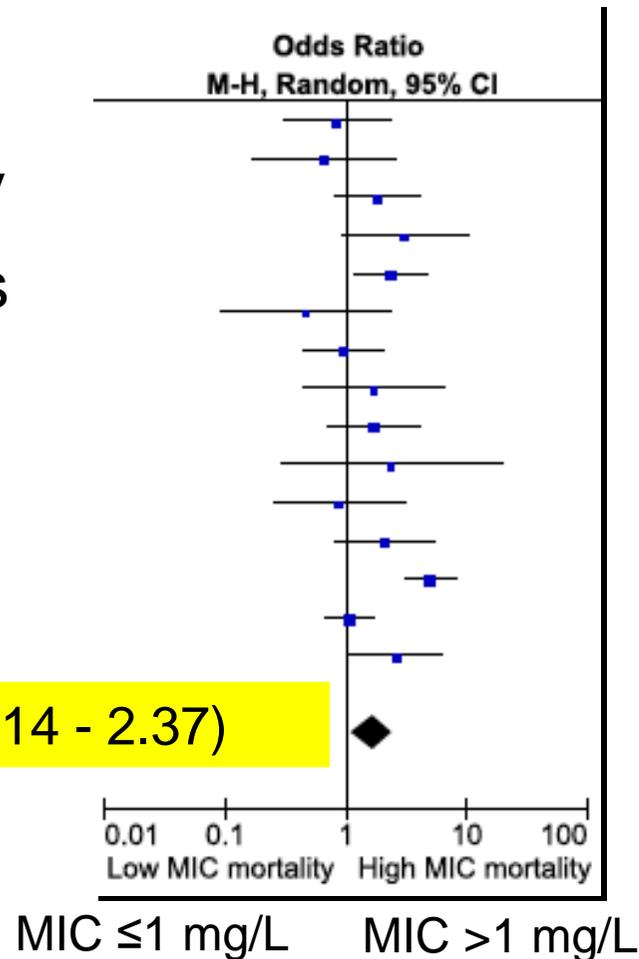
The Clinical Significance of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration in *Staphylococcus aureus* Infections: A Systematic Review and Meta-analysis

CID 2012

S. J. van Hal,^{1,2} T. P. Lodise,³ and D. L. Paterson⁴

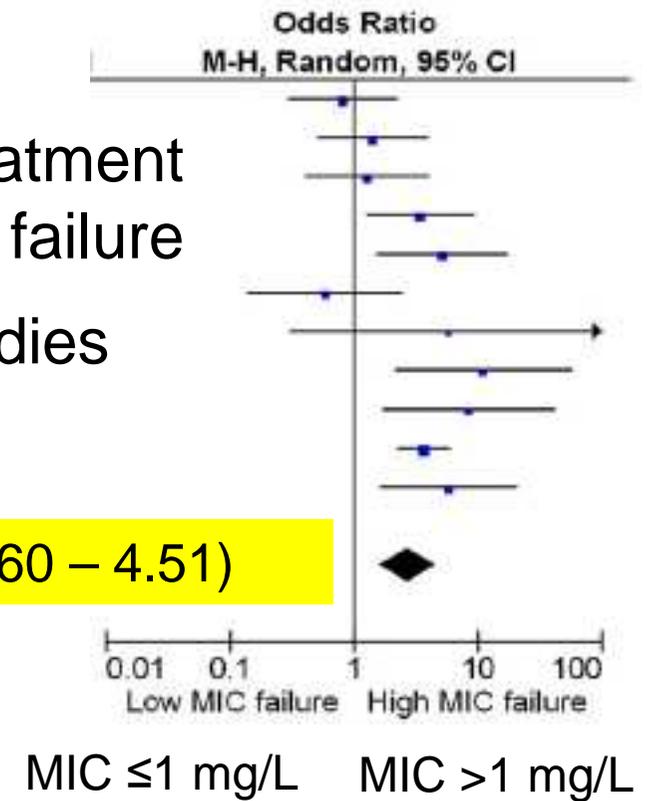
Mortality
15 studies

1.64 (1.14 - 2.37)



Treatment failure
11 studies

2.69 (1.60 - 4.51)



Impact of the MIC of Piperacillin-Tazobactam on the Outcome of Patients with Bacteremia Due to Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli*

Pilar Retamar,^a Lorena López-Cerero,^a Miguel Angel Muniain,^{a,b} Alvaro Pascual,^{a,c} Jesús Rodríguez-Baño,^{a,b}
 the ESBL-REIPI/GEIH Group

MIC PIP/TAZO	30-day mortality	
≤2 mg/L	0/18 (0%)	
4 - 8 mg/L	3/10 (30%)	S
>8 mg/L	4/7 (57%)	I/R

XDR *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotic	MIC mg/L (S/I/R)
Pip/Tazo	>16 R
Ceftazidime	>8 R
Cefepime	>8 R
Imipenem	>8 R
Meropenem	>8 R
Doripenem	>4 R
Aztreonam	>16 R
Amikacin	>16 R
Gentamicin	>4 R
Ciprofloxacin	>1 R
Colistin	2 S

XDR *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotic	MIC mg/L (S/I/R)
Pip/Tazo	>128 R
Ceftazidime	16 R
Cefepime	32 R
Imipenem	16 R
Meropenem	64 R
Doripenem	>8 R
Amikacin	>16 R
Gentamicin	>4 R
Ciprofloxacin	>2 R
Colistin	2 S

MIC estese, oltre i
breakpoint di R

Valori reali di MIC

Serve il meccanismo di resistenza?

Refertare in base al meccanismo di resistenza: il dogma di MRSA

- ✧ **presenza del meccanismo di resistenza (gene *mec*) = MRSA = R a tutti i β -lattamici tranne ceftarolina**
- ✧ **la rilevazione del gene *mec* è il *golden standard* per identificare MRSA**
- ✧ **cefoxitina/oxacillina screen: il miglior *proxy* per rilevare fenotipicamente il meccanismo**

mecA-Positive *Staphylococcus aureus* with Low-Level Oxacillin MIC in Taiwan

Feng-Jui Chen, I-Wen Huang, Chen-Her Wang, Pei-Chen Chen, Hui-Yin Wang, Jui-Fen Lai, Yih-Ru Shiau, Tsai-Ling Yang Lauderdale, and TSAR Hospitals

- ◆ Isolati di MRSA CC59:SCC*mecV* con basse MIC di oxacillina (1-2 mg/L)
- ◆ OXA screen non rileva il 60% degli isolati *mecA*+
- ◆ Cefoxitin screen più sensibile ma non rileva il 10% degli isolati *mecA*+

Importanza di avere a disposizione un test molecolare per conferma del gene *mec*

mecC⁺ MRSA increasingly detected in EU

MRSA Harboring *mecA* Variant Gene *mecC*, France

Frederic Laurent, Hubert Chardon,
Marisa Haenni, Michele Bes,
Marie-Elisabeth Reverdy, Jean-Yves Madec,
Evelyne Lagier, François Vandenesch,
and Anne Tristan

EID 2012

ORIGINAL ARTICLE

BACTERIOLOGY

Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans

CMI 2013

A. Petersen¹, M. Stegger¹, O. Heltberg², J. Christensen², A. Zeuthen², L. K. Knudsen², T. Urth⁴, M. Sorum¹, L. Schouls²,
J. Larsen¹, R. Skov¹ and A. R. Larsen¹

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene:
emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia

Fernando García-Garrote¹, Emilia Cercenado^{2,3*}, Mercedes Marín², Mercedes Bal⁴, Pilar Trincado⁵, Juan Corredoira⁶,
Carmen Ballesteros⁵, Julia Pita¹, Pilar Alonso¹ and Ana Vindel⁵

JAC 2013

Use of Vitek 2 Antimicrobial Susceptibility Profile To Identify *mecC* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Edward J. P. Cartwright,^{a,b,c} Gavin K. Paterson,^d Kathy E. Raven,^a Ewan M. Harrison,^d Theodore Gouliouris,^{a,b,c} Angela Kearns,^e Bruno Pichon,^e Giles Edwards,^f Robert L. Skov,^g Anders R. Larsen,^g Mark A. Holmes,^d Julian Parkhill,^h Sharon J. Peacock,^{a,b,c,h} M. Estée Török^{a,b,c}

JCM 2013

Il profilo oxacillina S – cefoxitina R restituito dal sistema Vitek2 identifica gli isolati di MRSA *mecC+* con alta sensibilità (89%) e specificità (99%)

Altri casi in cui è importante cercare il meccanismo di resistenza

✧ **ESBL?**

✧ **Carbapenemasi (KPC, VIM, OXA-48, NDM)**

✧ **Cfr?**

La gestione dei test di sensibilità nell'organizzazione del laboratorio

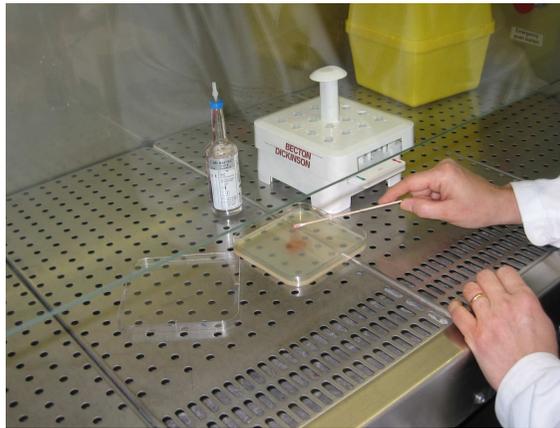
✧ **Accuratezza**

✧ **Completezza delle informazioni**

✧ **Rapidità dei risultati (TTR)**

Ridurre il TTR dell'antibiogramma

✧ **Antibiogramma “diretto” da emocoltura positiva (o altro campione clinico)**



- Buona correlazione con l'antibiogramma di riferimento
- Assenza di standardizzazione
- Rischio di false sensibilità (VME) per basso inoculo

Effettuato di routine dal 29% dei laboratori italiani (occasionalmente da un altro 23%)

Antibiogramma molecolare

- ✧ **Ricerca di determinanti di resistenza noti (su campione clinico, emocoltura positiva, isolato batterico)**
- ✧ **Mediante RT-PCR, *microarrays, targeted NGS***
- ✧ **TTR: 1 - 12 h**

Rapid Resistome Fingerprinting and Clonal Lineage Profiling of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Targeted Next-Generation Sequencing

Fabio Arena,^a P. Alexander Rolfe,^b Graeme Doran,^b Viola Conte,^a Sarah Gruszka,^b Thomas Clarke,^b Yemi Adesokan,^b Tommaso Giani,^a Gian Maria Rossolini^{a,c,d}

Sample (isolate or positive sample)



DNA extraction



highly multiplexed PCR
(R genes, housekeeping genes)



NGS run



Data interpretation

TTR: ≈12 hrs

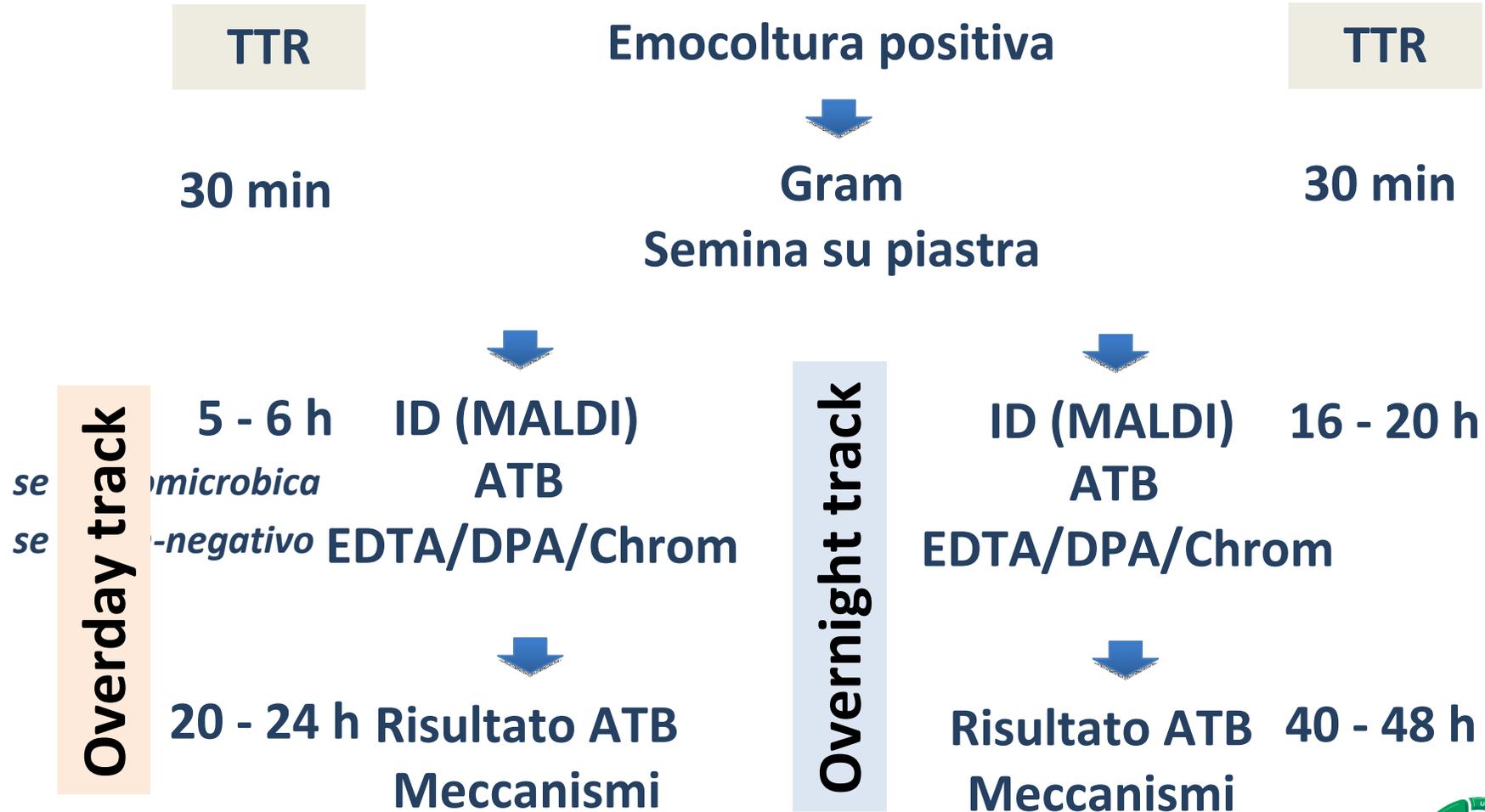
Info on several clinically relevant R genes

Clonal profiling resolution higher than PFGE

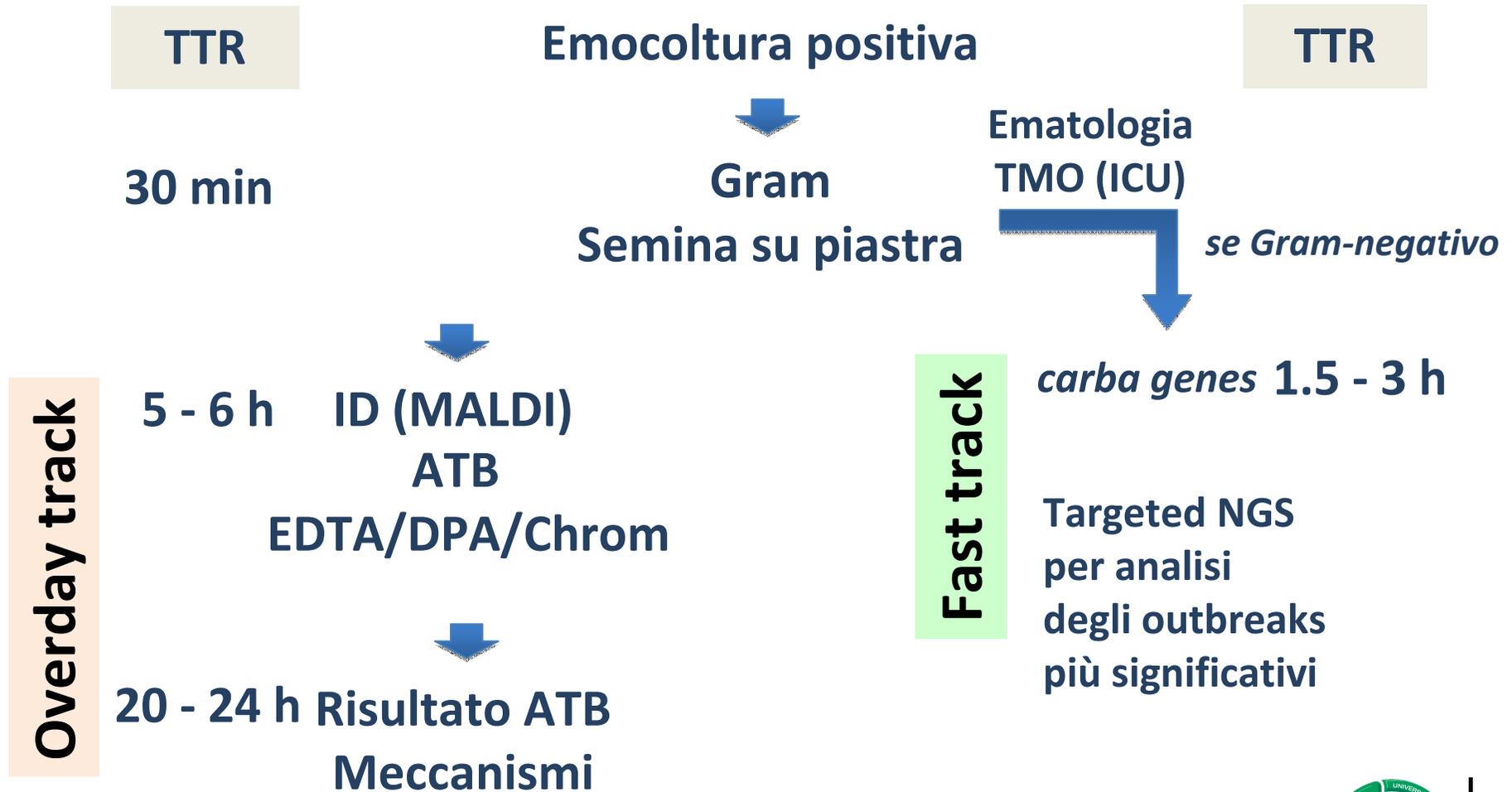
Antibiogramma molecolare

- ✧ **Ricerca di determinanti di resistenza noti (su campione clinico, emocoltura positiva, isolato batterico)**
- ✧ **Mediante RT-PCR, *microarrays*, *targeted NGS***
- ✧ **TTR: 1 - 12 h**
- ✧ **Limitazioni**
 - **copertura determinanti R**
 - **costo**
 - **false R (geni silenti)**

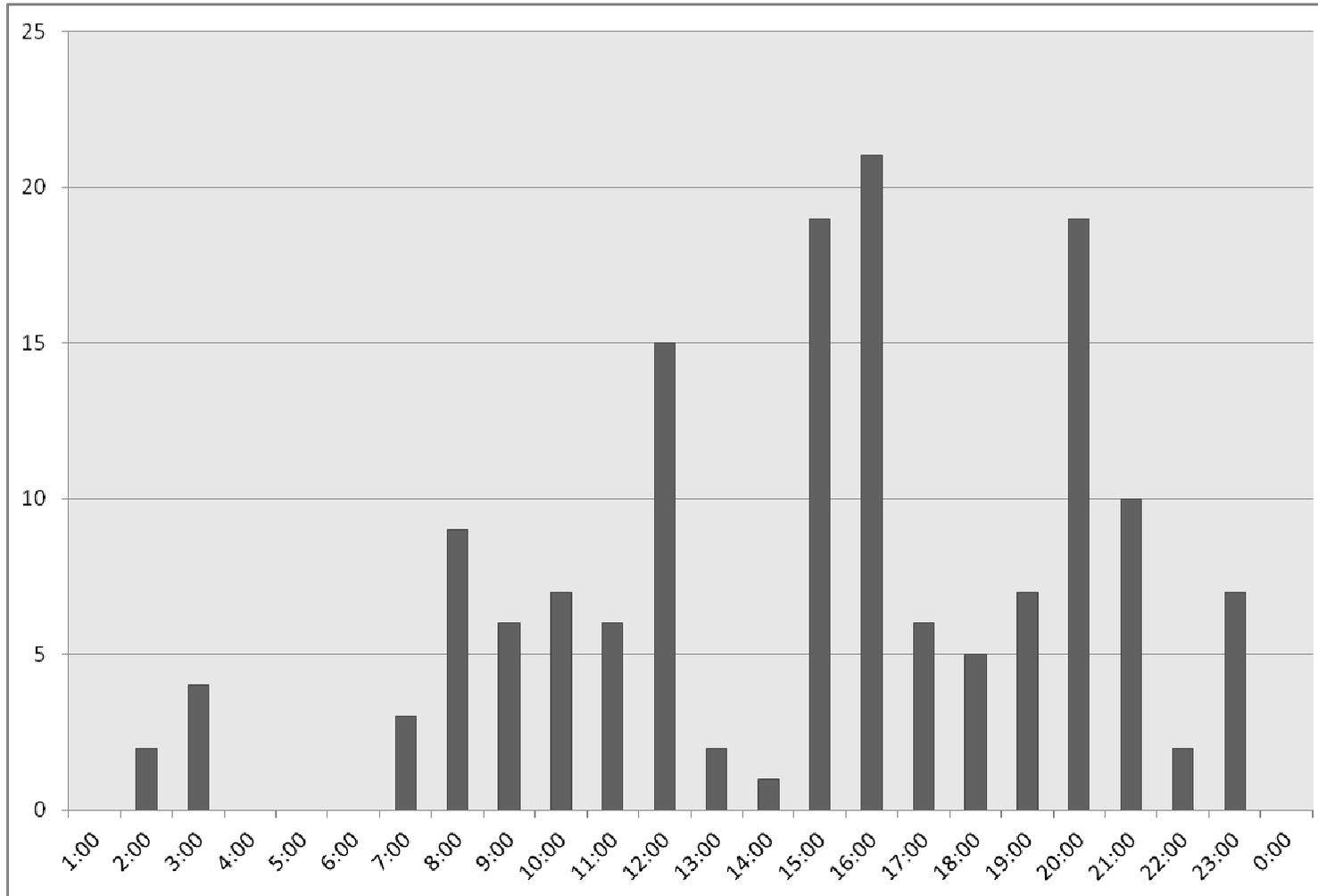
Workflow emocolture positive - Microbiologia AOUC



Workflow emocolture positive - Microbiologia AOUC



Nuove prescrizioni di antibiotici TICARD Siena



Conclusioni

- ✧ **Rilevanza clinica dei saggi di sensibilità (guida della terapia, epidemiologia, sorveglianza)**
- ✧ **Impatto rilevante dei saggi di sensibilità nella gestione del laboratorio: necessità di integrazione nel *workflow* (garantire accuratezza, completezza e rapidità)**
- ✧ **Personalizzazione del *workflow* AST in ciascun laboratorio e possibile diversificazione di percorsi**
- ✧ **Oltre l'antibiogramma convenzionale: antibiogramma molecolare e test di sinergia**