



Società Medico Chirurgica di Ferrara
Sabato 5 maggio 2012

Patologia infettiva emergente e riemergente

**Ruolo del laboratorio di Microbiologia Clinica e
novità nella diagnostica delle infezioni**

M.Rita Rossi

UO Semplice di Microbiologia e Sierologia
Laboratorio Unico Provinciale AOU S.Anna Ferrara



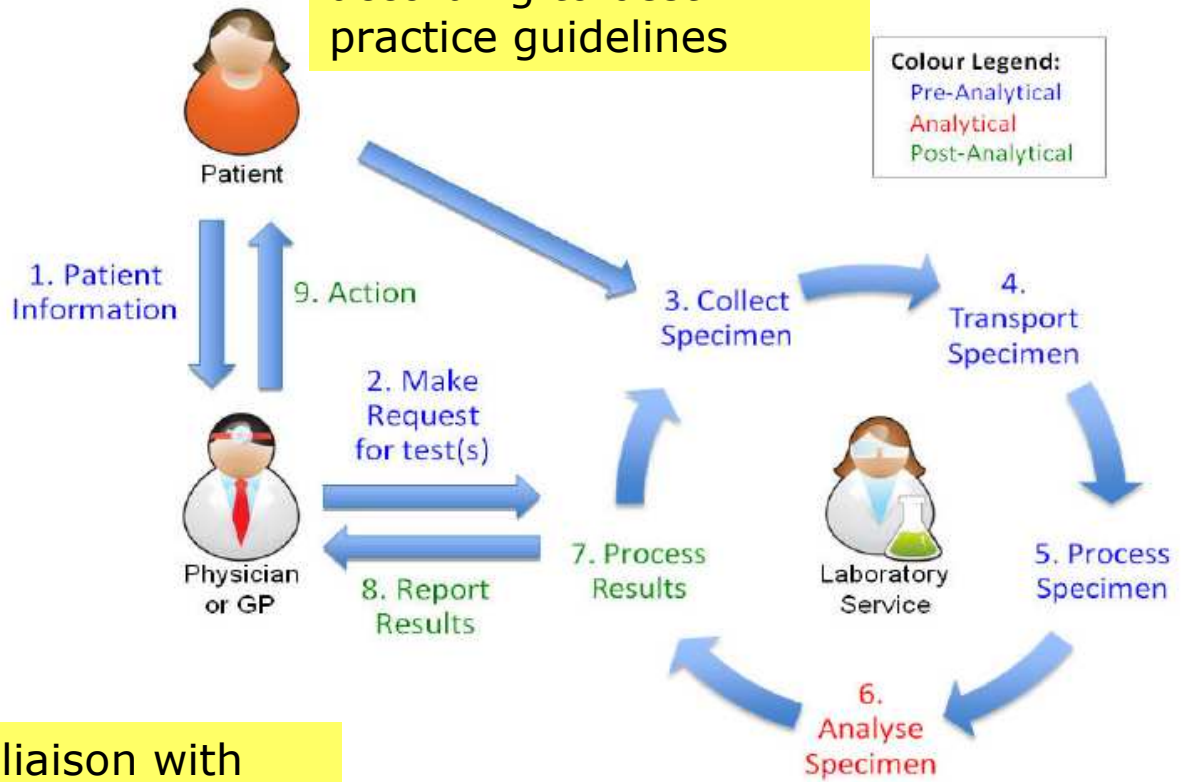
Premessa

- Le malattie infettive continuano a rappresentare un rischio per la salute pubblica
- Principali da aree da monitorare
 - Infezioni respiratorie (influenza e TBC)
 - Infezioni da HIV
 - Malattie infettive prevenibili con la vaccinazione (Pneumococco e Morbillo)
 - Infezioni correlate all'assistenza
 - Antibiotico resistenza
 - Malattie da microrganismi prima sconosciuti legate a cambiamenti climatici o ambientali che consentono la sopravvivenza e la diffusione di nuovi vettori, l'adattamento di specie (SARS, H1N1, influenza aviaria, Chikungunia e West Nile virus)

European Center for Disease Control sull'epidemiologia delle malattie infettive in Europa 2008

Establish procedures for microbiological and related collection according to best practice guidelines

A single **Request-Test- Report Cycle** for a patient may involve a number of medical and non medical health professionals, health institutions and commercial organisations



Regular patient-specific liaison with clinicians who care for patients at a high risk of infection



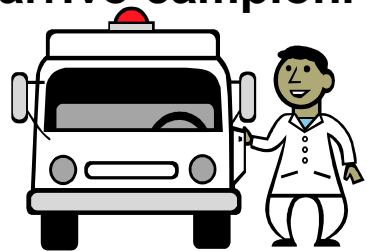
Gestione e organizzazione

- Utilizzo equo delle risorse umane ed economiche
- Organizzazione del lavoro (Logica LEAN: migliorare la velocità, flessibilità dei processi ed eliminare gli sprechi)
- Health Technology Assessment
- Costruzione di reti territoriali o di specialisti
- Percorsi diagnostico assistenziali

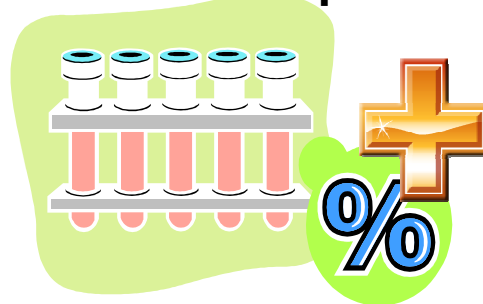
Laboratorio Unico Provinciale

Modulo Dipartimentale di Microbiologia e Sierologia

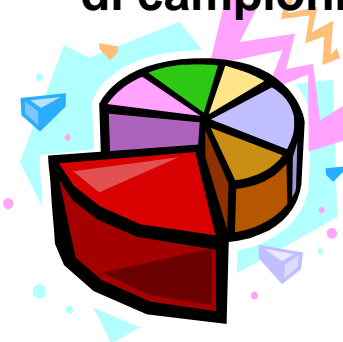
Tempi e frequenza di arrivo campioni



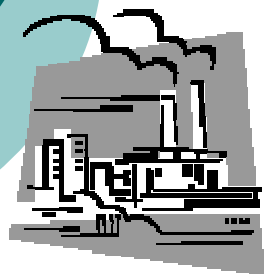
Tipologia campioni
Percentuale positività



Rapporto tra
differenti tipologie
di campioni



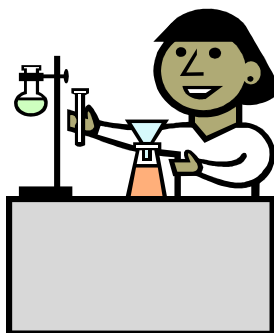
Laboratori / distretti coinvolti



« Lead time » o
« TAT » per ogni
tipo campione



Tipologia
Staff



Turni di lavoro



Metodi/Equipaggiamento



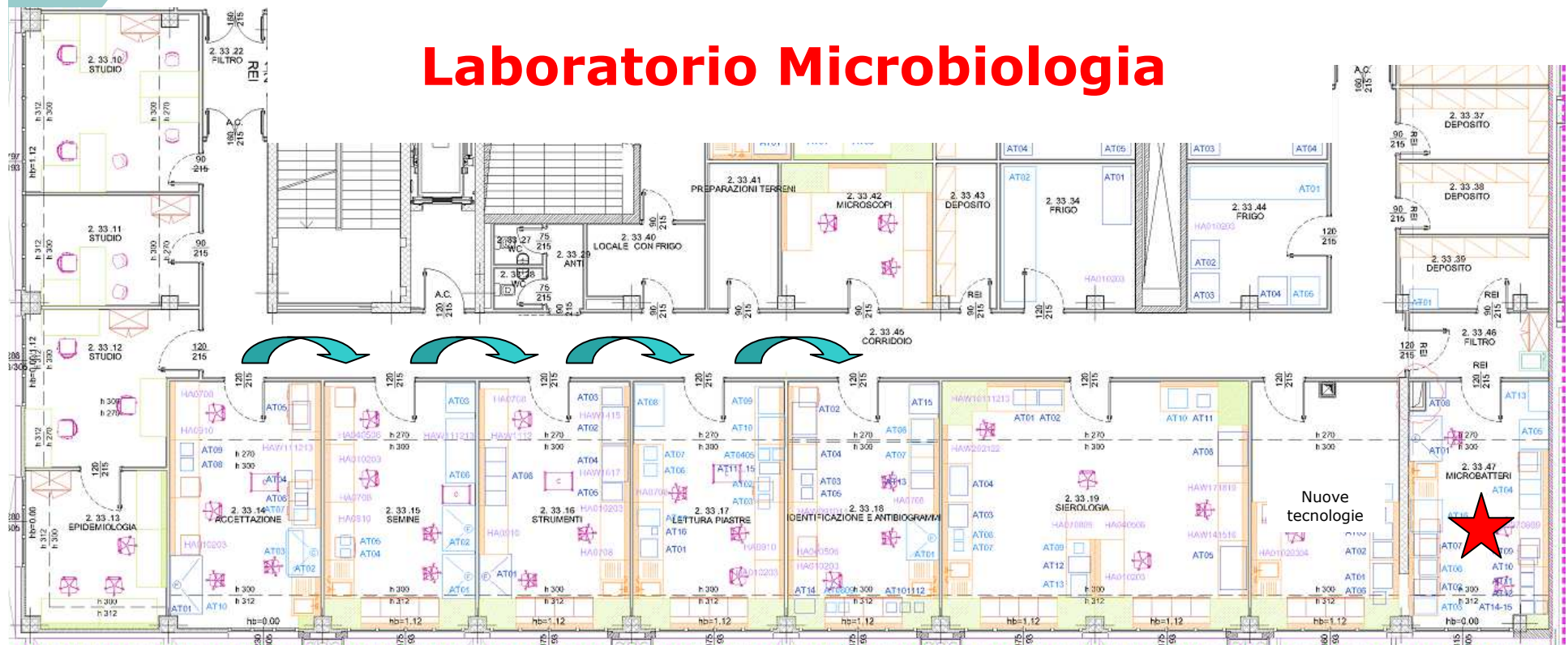
Nuovo Ospedale a CONA

Inserimento di nuovi strumenti e ricollocazione di quelli esistenti a favore di un processamento dei campioni secondo un

flusso più razionale

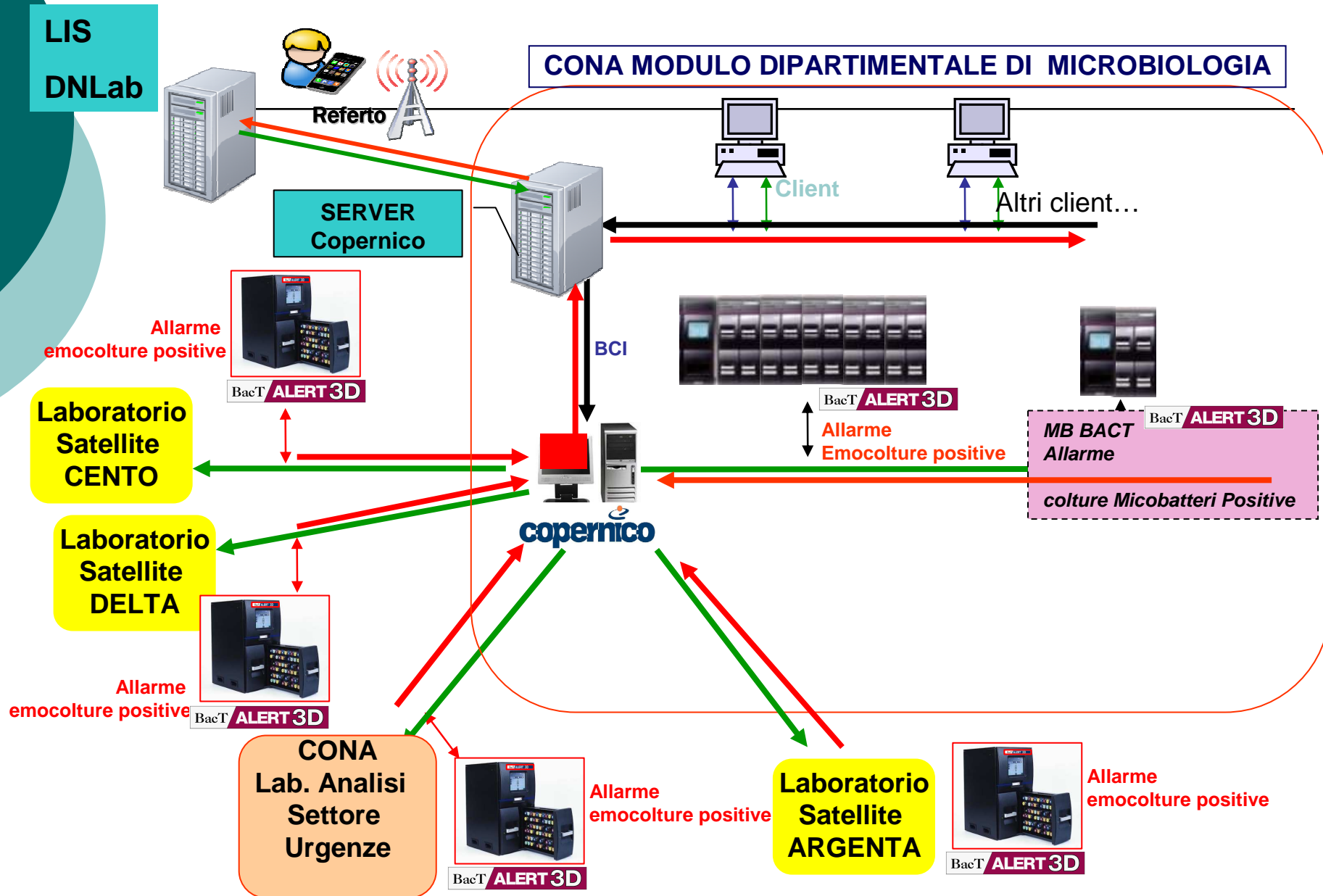
(no loop, distanze corte, sicurezza maggiore, guadagno spazi)

Laboratorio Microbiologia



Reingegnerizzazione del sistema emocoltura- Progetto LUP

Gestione in "real time" di emocolture a distanza





Wasp/semina manuale

Semina diretta dal contenitore primario

- Campioni in accesso random (LIS/HOST)
- Apertura e chiusura automatica del contenitore
- Identificazione automatica tramite codice a barre
- Centrifuga o vortex del campione
- **Etichettatura automatica delle piastre** originate da contenitore primario
- Utilizzo di piastre a singolo e/o multi settore
- Pattern di semina personalizzati
- Semina automatica per piastre pre-inoculate
- Utilizzo di ansa calibrata con controllo posizione e presenza campione ad ogni semina
- Sterilizzazione (al calore) dell'ansa programmabile dall'utilizzatore
- **HEPA filtro**
- Raccogliatore selettivo automatico a vani separati per piastre lavorate
- **Preparazione vetrini**
- Inoculo brodi e deposizione dischetti
- **Preparazione dei target MALDI-TOF**
- **Automazione dell'incubazione**
- **Scansione 3D della crescita su piastra**

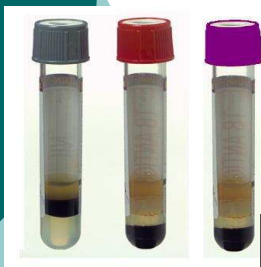


The WASP manages all specimen types & styles

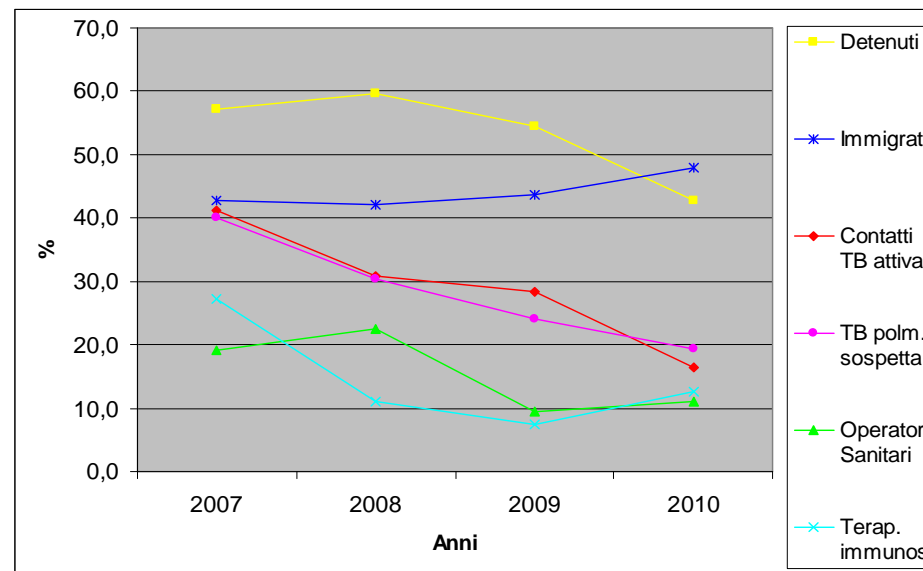
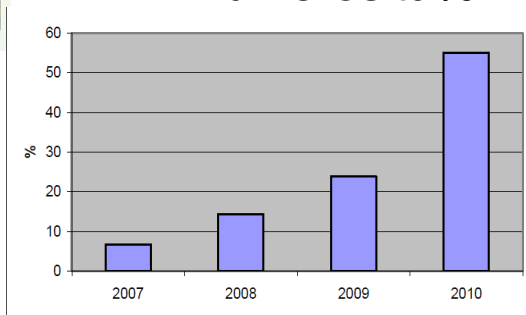


QuantiFERON-TB Gold In-Tube/Tuberculin Skin Test

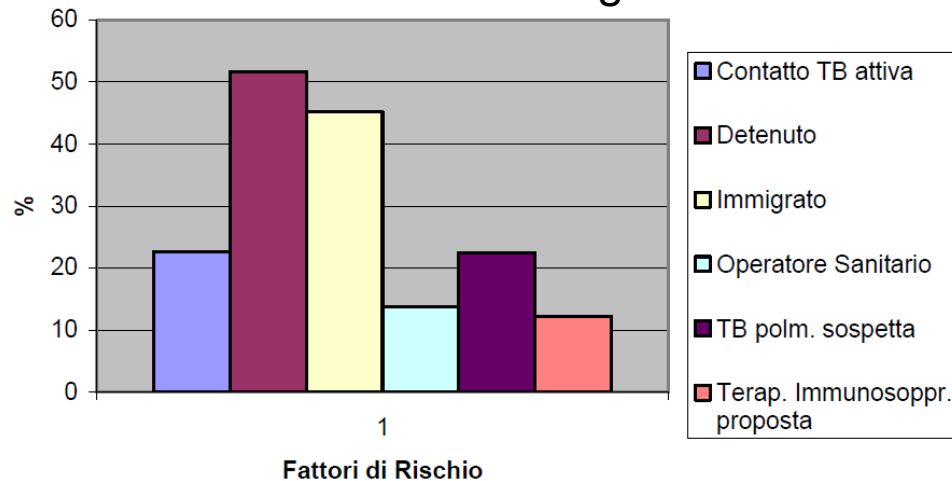
Studio della diffusione dell'Infezione Tuberculare Latente nella Provincia di Ferrara Da Marzo 2007 a Dicembre 2010 Archivio dati di 2818 pazienti



LTBI Numerosità%



LTBI Prevalenza% categorie



LTBI Incidenza%

TUBERCULIN SKIN TEST (TST)





Diagnosi rapida

○ Attualità

- Antigene urinario Legionella e Pneumococco
- Malaria
- C.difficile
- Rotavirus-Adenovirus-Norovirus
- Streptococcus gr A
- **PCRTBC+ RIFA**

○ Prospettive

- Identificazione in 20 minuti con spettrometria di massa Maldi TOF
- PCR real time multiplex per identificazione e antibiogramma
- Microarray
- FISH

Da Luglio 2011 **GeneXpert®**

Nested PCR Real time per

determinazione **one step** di:

M. tuberculosis complex +
resistenza alla rifampicina

Si esegue su materiali respiratori e non respiratori

Tutto il test è eseguito in una cartuccia monouso

1. Estrazione
2. Amplificazione
3. Rivelazione

Tempo di esecuzione 90 minuti

Sensibilità analitica è circa 50 - 100 cfu/ml

Referto entro 24 ore/18 gg per coltura+7 antibiogramma

Random access/ batch-> recupero ore lavoro



Cepheid Tecnologia **GeneXpert®**

- Influenza A e variante H1N1 (*tampone nasofaringeo*)
- **MRSA/SA** (*tampone nasale*)
- VanA/VanB screening (*tampone rettale*)
- GBS (*tampone vagino-rettale*)
- Enterovirus (*liquor*)
- C.difficile tossina A, tossina B e tossina binaria (*feci*)
- *Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae*



MRSA

VanA

GBS

H1N1

FilmArray® System User Friendly Multiplex PCR

Pannello Respiratori FDA Cleared

Blood culture ID – Gastroenteriti - STI

**Risultati in
1 ora**

Idaho Technology Inc.

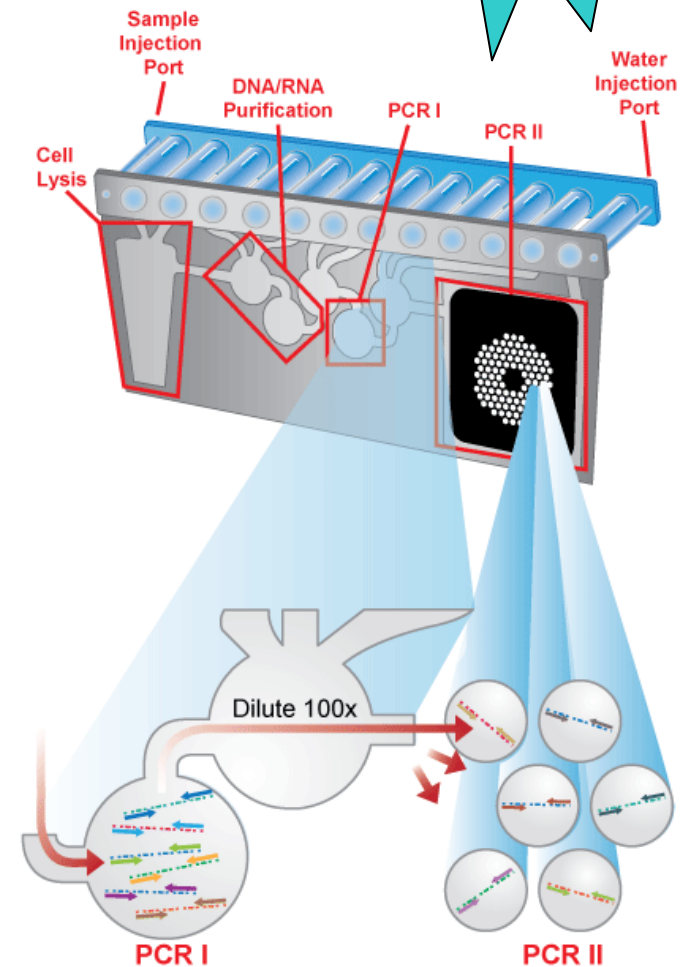
TARGET

18 VIRUS:

*Adenovirus, Coronavirus, Enterovirus,
Influenza Parainfluenza,
Metapneumovirus RSV, Rhinovirus*

3 BATTERI:

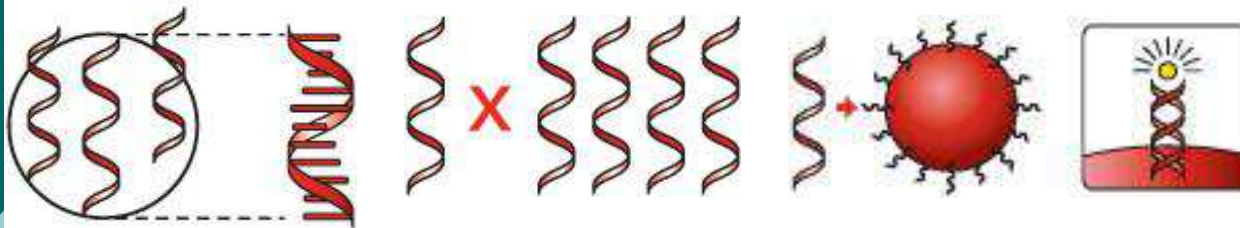
*Bordetella pertussis, Chlamydomphila
pneumoniae, Mycoplasma
pneumoniae*



Luminex

NEW xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel (GPP)

**Risultati
in 5 ore**



Step 1:

Extraction of nucleic acids

Step 2:

Multiplex RT-PCR

Step 3:

Bead hybridization

Step 4:

Signal detection and analysis

TARGET

Batteri: *Salmonella*, *Shigella*,
Campylobacter, *Yersinia enterocolitica*
E.coli enterotossigeno, *C.difficile* tossine
A/B, *Vibrio cholerae*

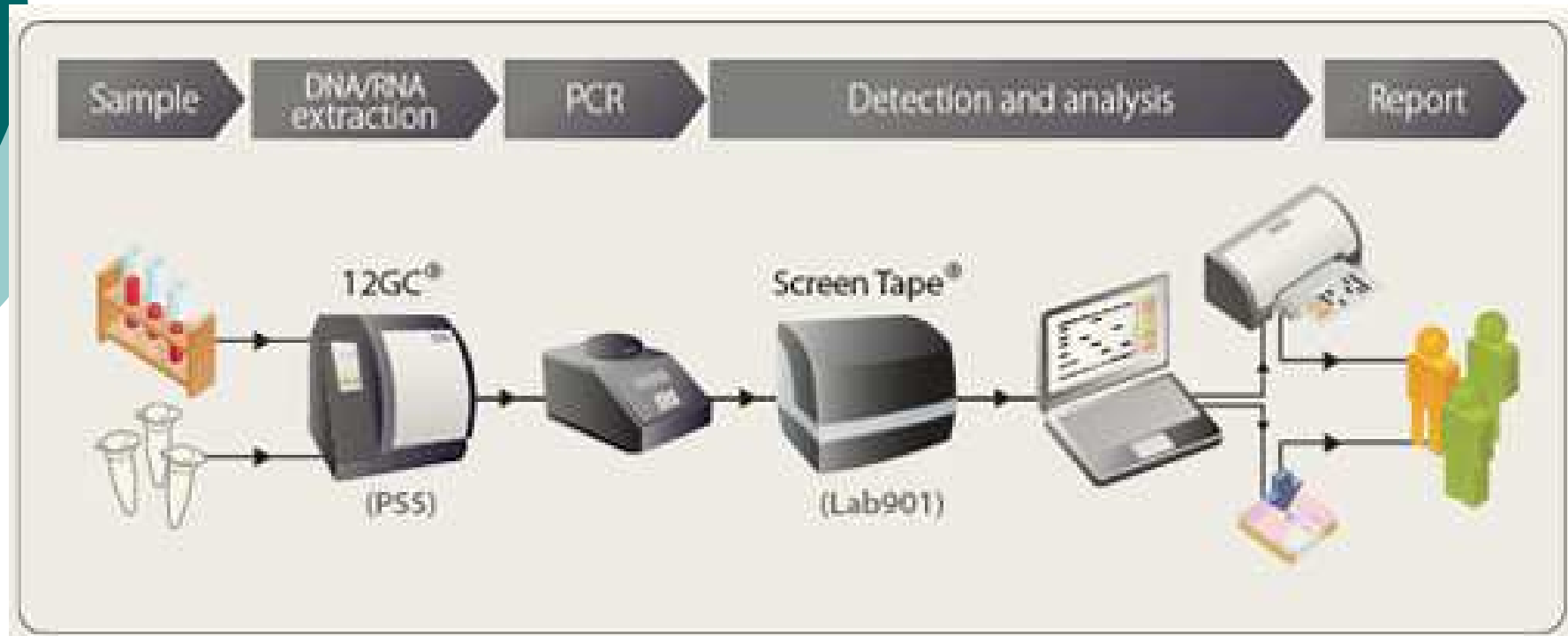
Virus: *Adenovirus 40/41*, *Rotavirus A*,
Norovirus GI/GII

Parassiti: *Giardia lamblia*,
Cryptosporidium, *Entamoeba histolytica*



Multiplex PCR

Seeplex System for automatic Detection (Seegene)



TAT 5 ore, applicabile su campioni di **sangue**, materiale periodontale, liquido articolare, **liquor**, sputo e altri liquidi biologici

Target 64 patogeni e 4 geni di resistenza

Meningitis ACE detection Seegene

Multiplex PCR



Pathogen List of Seeplex[®] Meningitis ACE Detection

Virus panel

[6 DNA Viruses]

HSV1
HSV2
VZV (HHV3)
EBV (HHV4)
CMV (HHV5)
HHV6

[RNA Virus]

Enteroviruses
- Poliovirus
- Echovirus
- Coxsackievirus

Bacteria panel

[5 Bacteria]

Streptococcus pneumoniae
Neisseria meningitidis
Haemophilus influenzae type b
Listeria monocytogenes
Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*)

Identificazione batteri aerobi, anaerobi, micobatteri e miceti

MALDI-TOF /id. biochimica

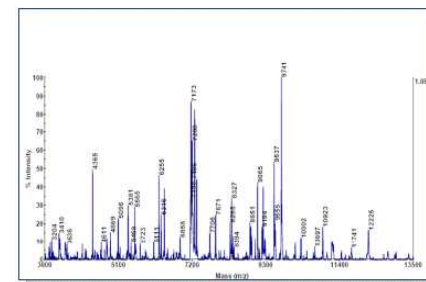
(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight)



Lanciato a Maggio 2011 in Europa, il VITEK® MS consiste in uno strumento per la

spettrometria di massa e una soluzione informatica progettati per l'identificazione rapida di microrganismi basata sulla tecnologia MALDI-TOF.

L'identificazione microbica viene raggiunta tramite l'ottenimento di spettri, analizzati con l'ausilio del database presente nel VITEK®MS.

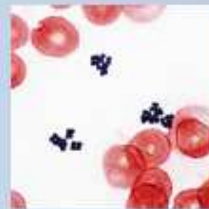


Il test PNA-**FISH** si basa sull'utilizzo di sonde fluorescenti di Peptidi di Acido Nucleico (PNA) altamente sensibili e specie-specifici che si ibridano al RNA ribosomiale (rRNA) dei microrganismi target.



Emocoltura positiva

Gram Stain



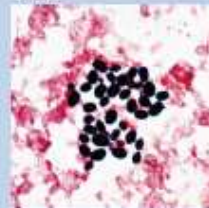
GPCC



GPCPC

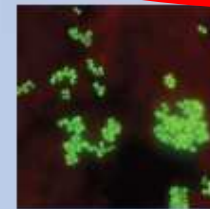


GNR



Yeast

QuickFISH™ (20 Min. Pathogen ID)



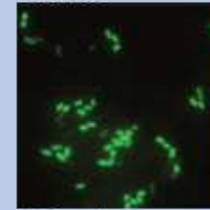
S. aureus



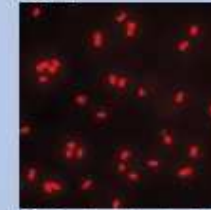
CoNS



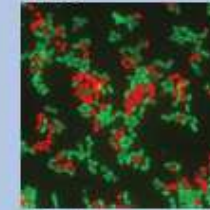
Mixed



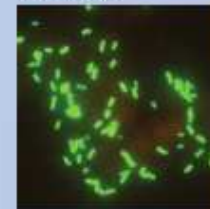
E. faecalis



E. faecium & other NFE*



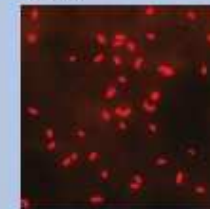
Mixed



E. coli



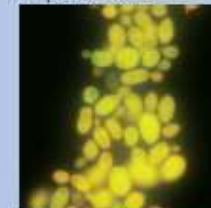
K. pneumoniae



P. aeruginosa



C. albicans



C. parapsilosis



C. glabrata

3 Easy Steps: Fix Sample, Hybridize Probes and View Results.
5 Min. Hands-on Time. 20 Min. Turn-around Time.



*NFE = non-faecalis enterococci



Sorveglianza

- Segnalazione malattie infettive
- Sorveglianza e controllo degli “alert organisms”
- Report epidemiologici e monitoraggio delle resistenza agli antibiotici
- Estrazione dati epidemiologici a livello locale, regionale e nazionale



Indicazioni pratiche e protocollo operativo
per la diagnosi, la sorveglianza e il controllo degli
**enterobatteri produttori di carbapenemasi
resistenti ai carbapenemi (CRE) e/o intermedi (CIE)**

- INTERVENIRE E' UNA PRIORITA' -

Laboratorio di
Microbiologia

Gestione della diagnosi microbiologica

Riconoscimento dei meccanismi di
resistenza
Sorveglianza microbiologica

Gestione clinico assistenziale

Politica antibiotica
Politica degli approvvigionamenti
Tailored therapy

Gestione dei comportamenti

Sorveglianza dei dati
Colture di sorveglianza
Verifica dell'operatività in reparto
Gestione del paziente colonizzato
Misure di isolamento
Ecc...



I test di laboratorio

La produzione di carbapenemasi può essere talvolta piuttosto scarsa in vitro e ciò può condizionare il

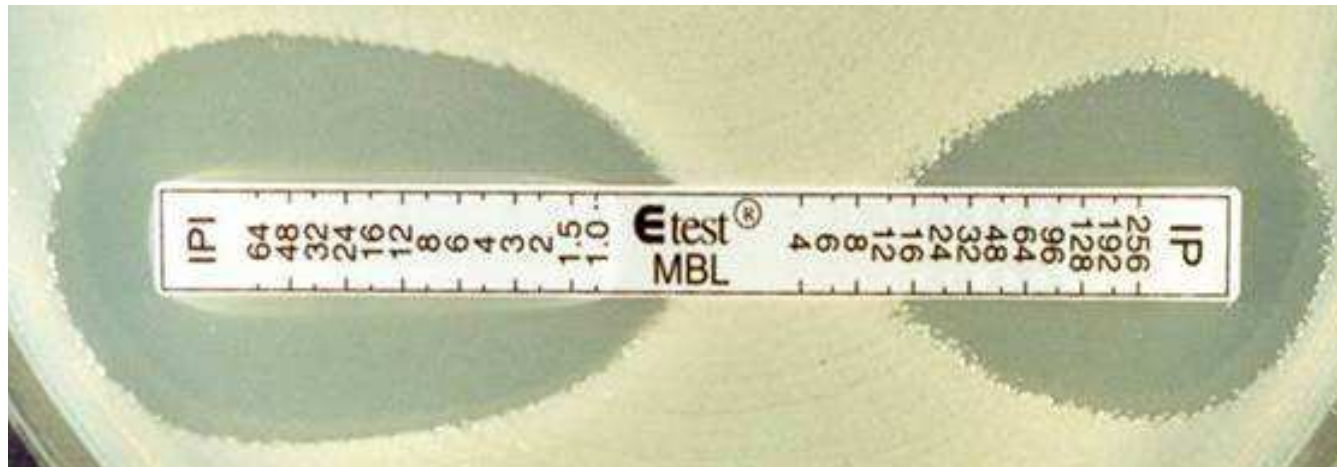
riconoscimento del meccanismo di resistenza:

1. Ridotta sensibilità conseguente ad impermeabilità
2. Iper-espressione di pompe di efflusso
3. Resistenza di tipo enzimatico

Test di sinergia per rilievo fenotipico della produzione di carbapenemasi

Etest[®] per MBL

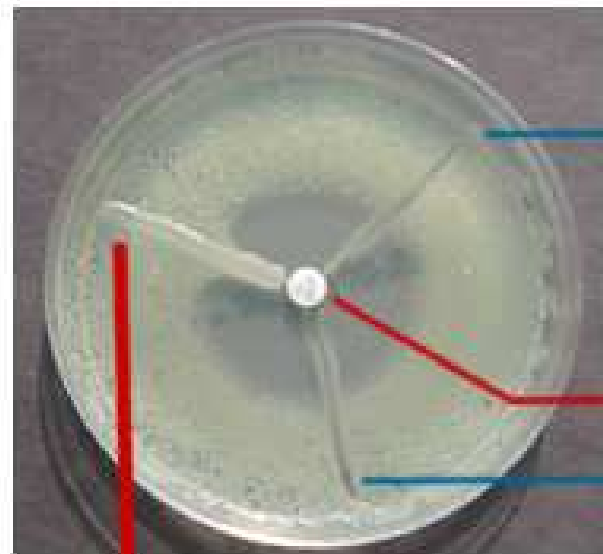
IPI riduzione di 3 diluizioni vs IP
oppure $IP/IPI \geq 8$
Deformazione dell'ellisse o phantom zone



IPI (Imipenem più EDTA) ≤ 1

IP (Imipenem) 16

Hodge test Test che sfrutta la capacità delle carbapenemasi, diffondendo nell'agar circostante un microrganismo produttore, di proteggere dall'azione dei carbapenemi ceppi sensibili, posti sulla stessa piastra



→ *K. pneumoniae*
Negative Control
MicroBioLogics® # 01006
ATCC® BAA-1706™*

→ Meropenem Disk

→ Negative Test Isolate

↓

K. pneumoniae
Positive Control
MicroBioLogics® # 01005 ATCC® BAA-1705™*

MHT Using MicroBioLogics Quality Control Microorganisms



Test di biologia molecolare

Da utilizzare nel caso di sospette condizioni epidemiche, permettono di identificare i determinanti di resistenza in gioco

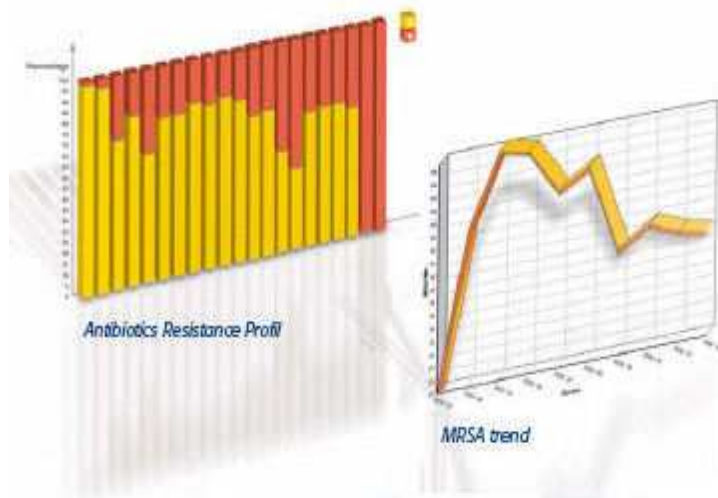
IPM, VIM, GIM, SIM, KHM, AIM, NDM, DIM, KPC e OXA

Nota: i geni che codificano per le carbapenemasi sono spesso **in associazione** con altri che determinano multiresistenza, quali determinanti di resistenza agli aminoglicosidi, ai fluorochinoloni o che codificano per ESBL

VIGuard - Aggiornamento tecnologico programma epidemiologico associato a Vitek2 (strumento identificazione e antibiogramma)



Decisioni terapeutiche più rapide per
il paziente grazie ad allarmi in tempo
reale inviati **via mail**

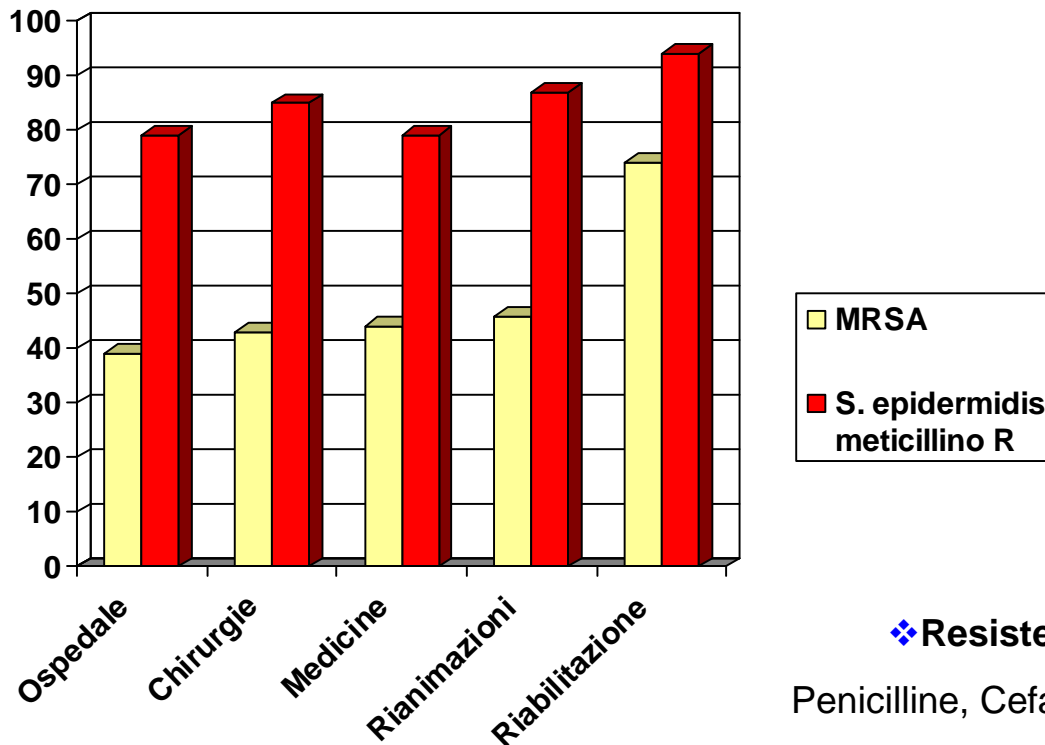


Aumento della rilevanza clinica,
tramite statistiche sui risultati in
tempo reale (dati sull'attività ed
epidemiologici)

**Query automatiche e
sistematiche** per consolidamento
di determinati dati = riduzione
delle richieste query in manuale



Meticillino-Resistenza: impatto clinico



- ❖ **Resistente a tutti gli altri beta lattamici**

Penicilline, Cefalosporine, Carbapenemi

- ❖ **Resistenza associata ad altre classi di antibiotici**

Clindamicina, Cotrimossazolo, Fluorochinoloni

- ❖ **Glicopeptidi spesso unica opzione terapeutica**

Vancomicina e Teicoplanina

- ❖ **Nuovi antibiotici...**

S. aureus AOU S. Anna

Distribuzione MIC II° semestre 2011



MIC breakpoint (mg/L)	
S ≤	R >

	Antibiotico	EUCAST S ≤
<i>S.aureus</i>	Linezolid	4
	Tigeciclina	0.5
	Teicoplanina	2
	Vancomicina	2

<i>S.aureus</i>	Antibiotico	ceppi	Concentrazioni testate											
			≤0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	
	Linezolid	252					14	228	9	1				
	Tigeciclina	252		239	12	1								
	Teicoplanina	252		1		235	7	9						
	Vancomicina	252				129	104	19						

Staph. Coagulasi negativa AOU S.Anna

Distribuzione MIC II° semestre 2011



MIC breakpoint (mg/L)	
S ≤	R >

	Antibiotico	EUCAST S ≤
<i>Staph. Coagulasi negativa</i>	Linezolid	4
	Tigeciclina	0.5
	Teicoplanina	4
	Vancomicina	4
	Daptomicina	1

<i>Staph. coag neg</i>	Antibiotico	ceppi	Concentrazioni testate										
			≤0.062 5	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
	Linezolid	316				7	156	143	10	1			
	Tigeciclina	316		295	12	6		2					
	Teicoplanina	316			1	103	20	71	90	25	4	2	
	Vancomicina	316				61	165	86	4				
	Daptomicina	3		1		2							



Partecipazione e Formazione

- CCIOS
- Gruppi di lavoro regionali e aziendali finalizzati
- Gruppi di ricerca in collaborazione con i clinici
- Consolidamento delle conoscenze di base
- Sviluppo di nuove capacità
- Controllo e coordinamento dei collaboratori
- Indicazioni per raccolta, conservazione e trasporto dei campioni
- Report interpretati (note a referto)



Ruolo del Laboratorio di Microbiologia

- Clinico diagnostico
- Gestionale
- Organizzazione
- Sorveglianza
- Partecipazione
- Formazione



**Tutte le
professionalità
sono coinvolte!**



Valore del Laboratorio di Microbiologia

- Conosciamo il prezzo delle cose , spesso non conosciamo il loro valore (Es. Joshua Bell, concerto nella stazione nessuno riconosce il genio del violino)
- La Microbiologia ha un costo, costa soprattutto la fase organizzativa con revisione degli schemi di lavoro e l'attivazione di nuove tecnologie
- La Microbiologia vale per l'output che ottiene e il conseguente outcome clinico



Crycetomis gambianus

Anno 2003- Qui c'è "puzza" di... tubercolosi

verso il futuro....

verso il futuro....



Grazie per l'attenzione