

Infezioni batteriche emergenti: ruolo del Microbiologo



Gian Maria Rossolini

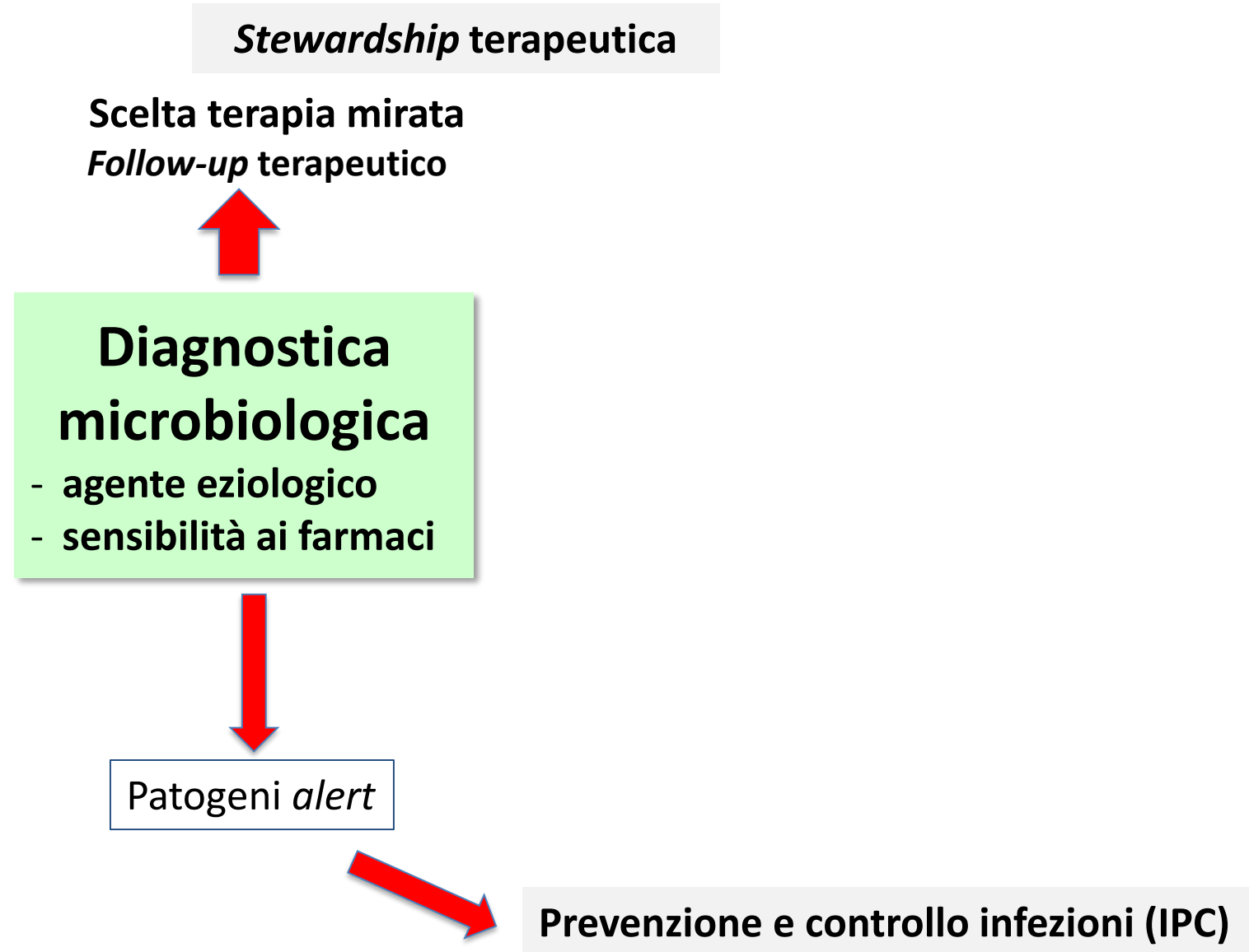
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica
Università di Firenze

SODc Microbiologia e Virologia
Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze



Dichiarazione su rapporti di natura finanziaria e/o lavorativa con imprese commerciali in ambito sanitario (consulenze, presentazioni a congressi/corsi, redazione articoli scientifici, e/o grant al laboratorio): ADA, Advanz pharma, Alifax, Angelini, Arrow, Biomedical Service, bioMérieux, Cepheid, Hain Life Sciences, Menarini, Meridian, MSD, Pfizer, Qiagen, Q-Linea, Quantamatrix, Quidel, Qvella, SD Biosensor, Seegene, Shionogi, Symcel, Viatrix

Il contributo della microbiologia clinica nella gestione delle infezioni batteriche



Marzo 2024: un isolato clinico riferito da altro laboratorio ...

ID: *Pseudomonas* spp.

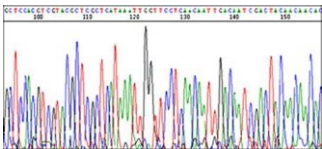


Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Pip-Tazob	≤1 I
Cefepime	>8 R
Ceftazidime	4 I
Meropenem	≤1 S
Imipenem	≤1 I
Ceftol-Tazob	2 S
Ceftaz-Avib	≤1 S
Aztreonam	16 R
Amikacina	16 (S)
Tobramicina	>4 R
Levofloxacin	0.5 I
Ciprofloxacina	0.5 I
Colistina	>8 R



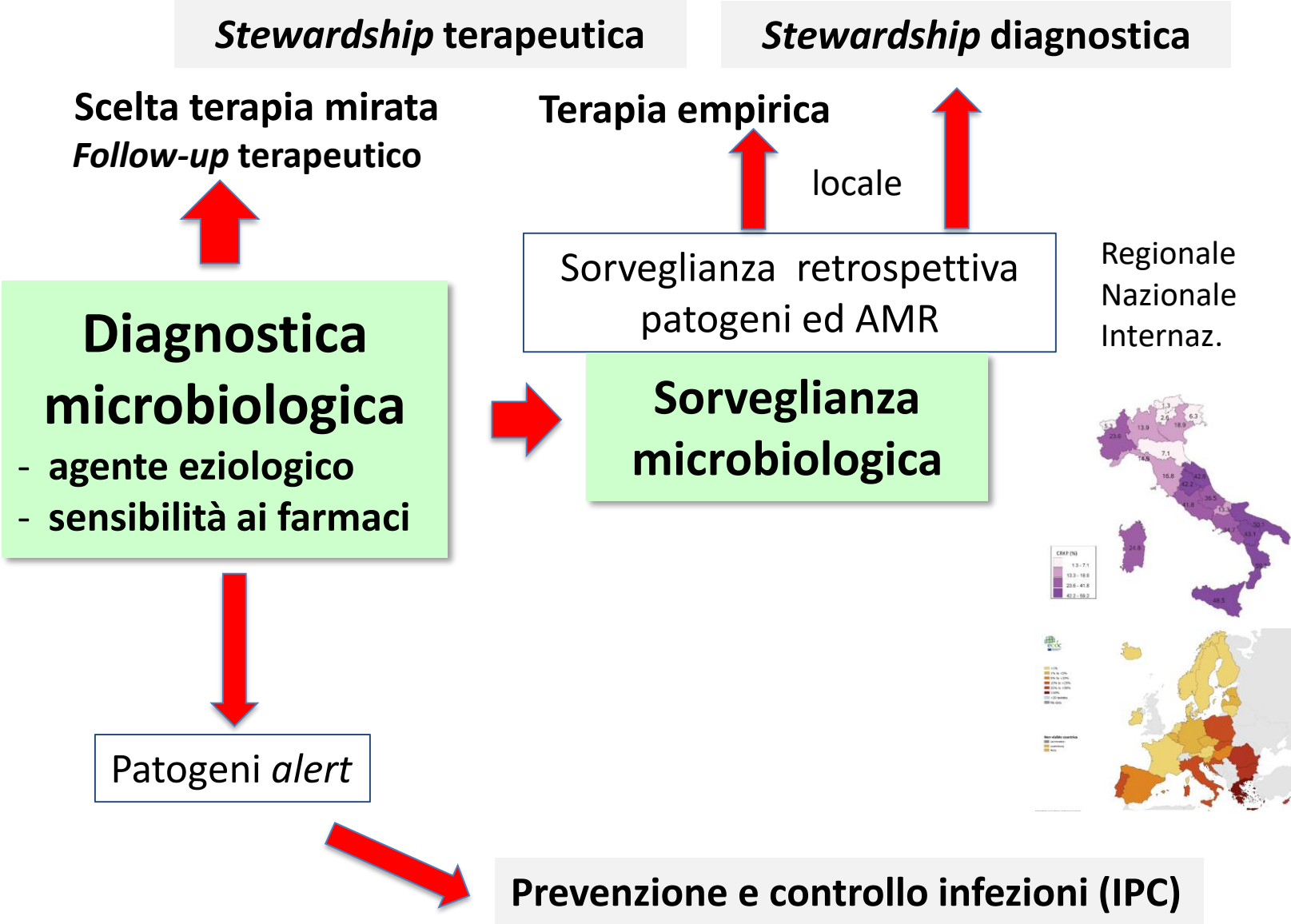
??

16S rDNA sequencing:

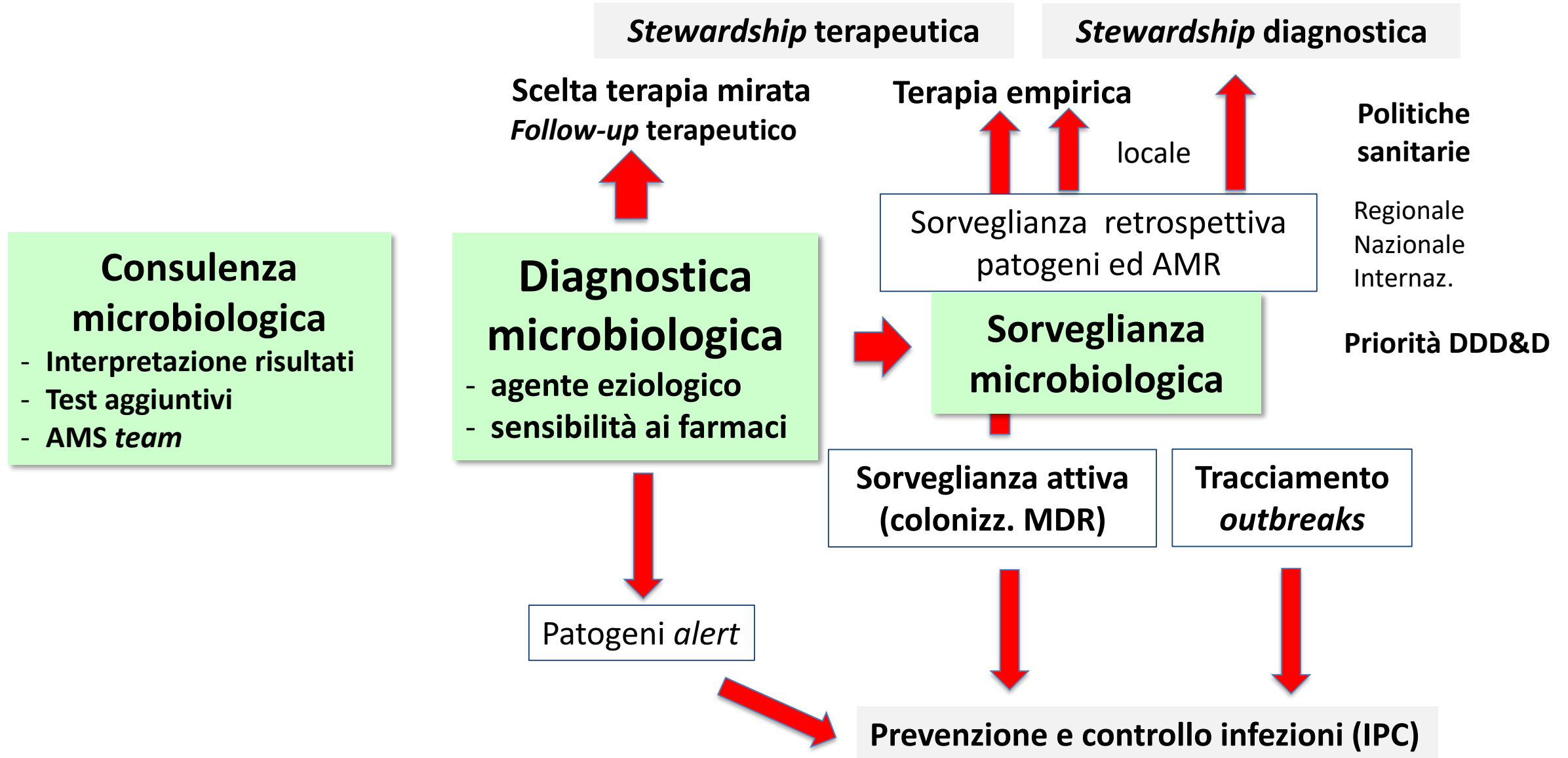


Burkholderia pseudomallei

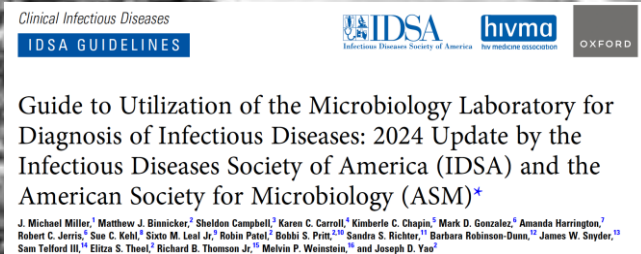
Il contributo della microbiologia clinica nella gestione delle infezioni batteriche



Il contributo della microbiologia clinica nella gestione delle infezioni batteriche



Diagnostica microbiologica colturale: ancora oggi standard di riferimento



- Altamente standardizzata
- Antibiogramma fenotipico ampiamente validato come *proxy* per predizione efficacia clinica

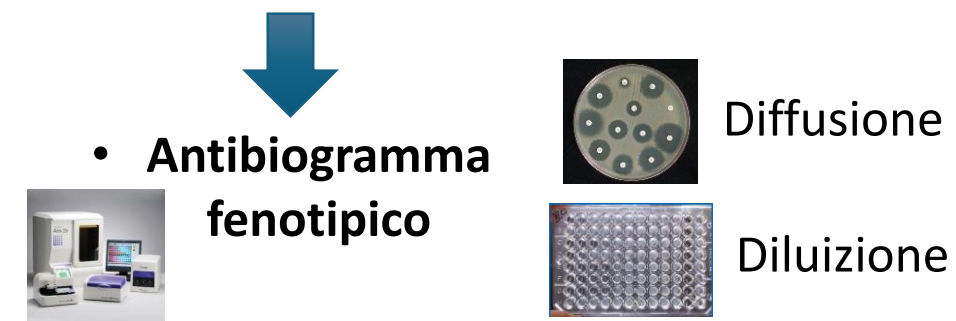
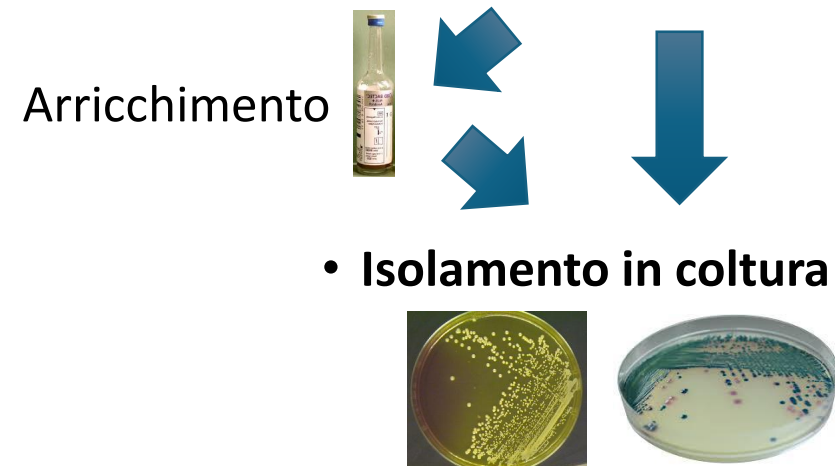
CATEGORIA DI SENSIBILITA' (per ogni antibiotico saggiato)

S = sensibile, dosaggio standard

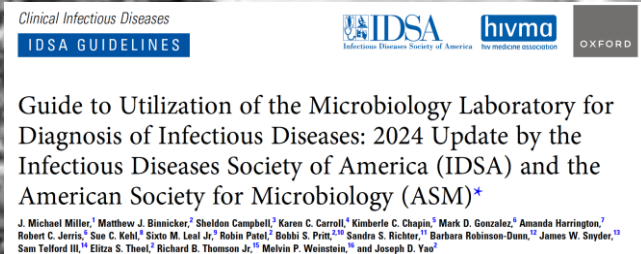
I = sensibile, esposizione aumentata

R = resistente

- **Campione clinico** (sangue, urina, escreato, liquor, essudati ...)



Diagnostica microbiologica colturale: ancora oggi standard di riferimento



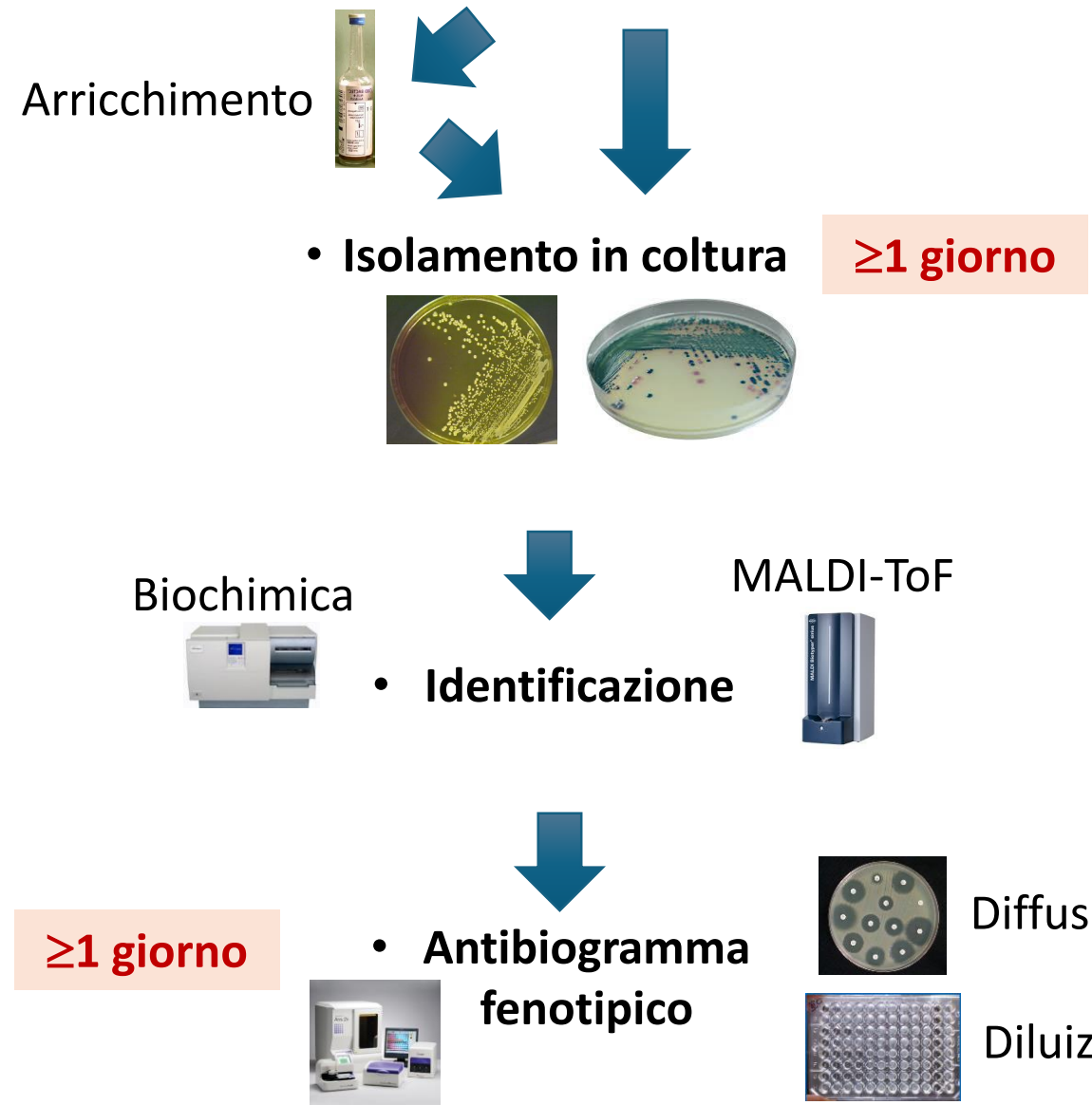
○ Altamente standardizzata

○ Antibiogramma fenotipico ampiamente validato
come *proxy* per predizione efficacia clinica

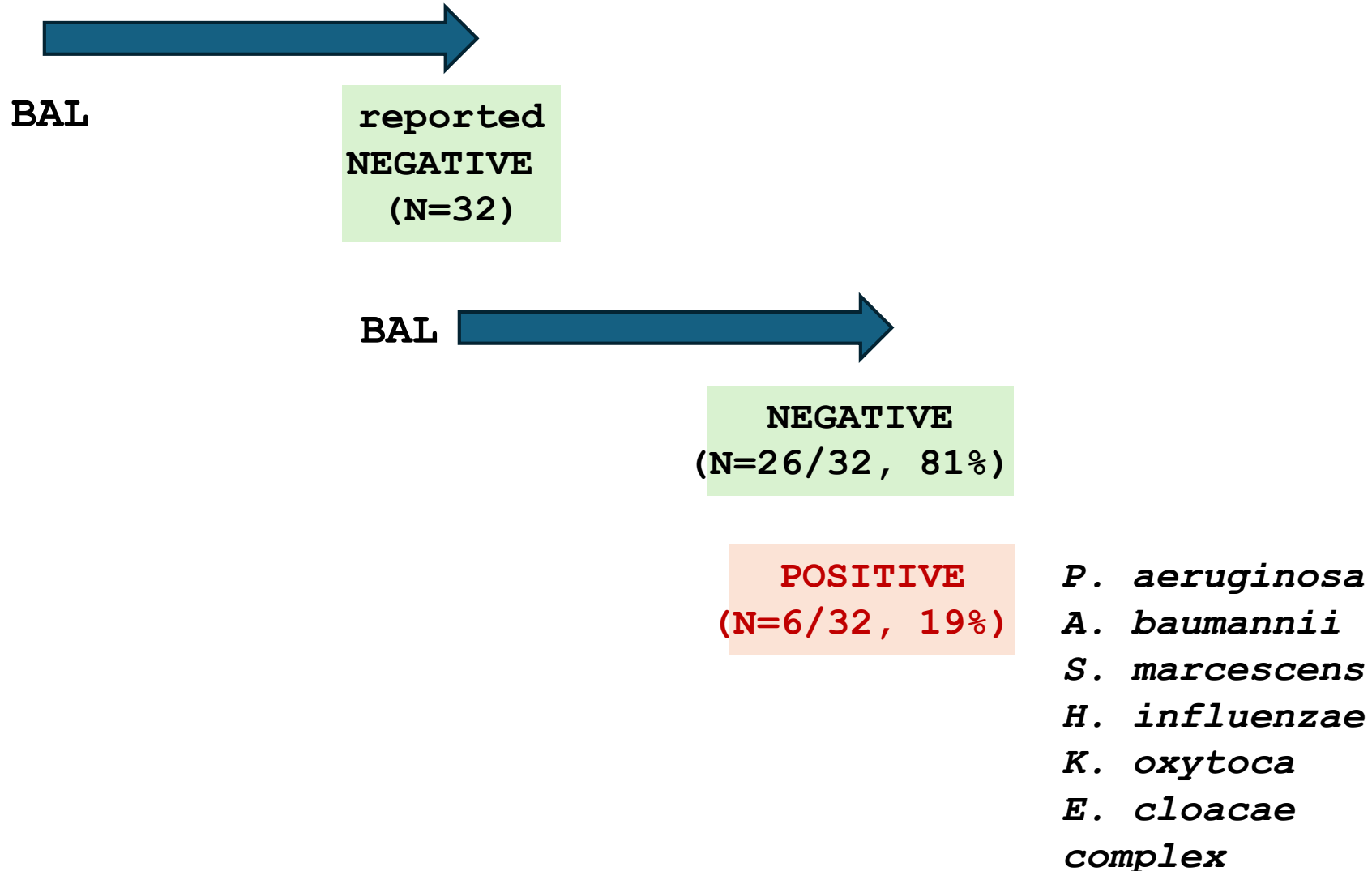
○ Lentezza (≥ 2 giorni)

- Terapia empirica iniziale: ineludibile
- I risultati riportati nel referto potrebbero non riflettere lo scenario microbiologico attuale (una foto del passato...)

- **Campione clinico** (sangue, urina, escreato, liquor, essudati ...)



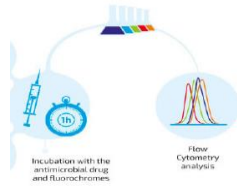
BAL testing: actual microbiological landscape at the time of reporting



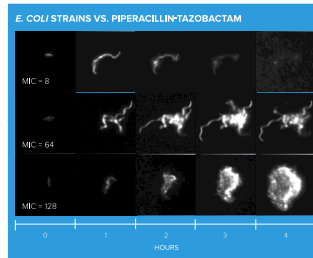
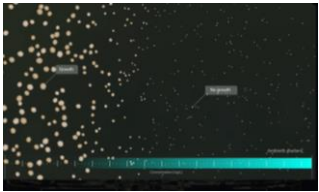
Diagnostica microbiologica colturale:

recenti evoluzioni

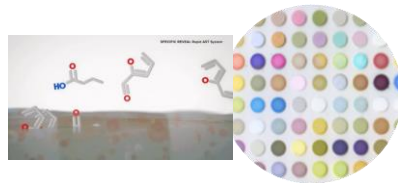
Citofluorimetria



Imaging

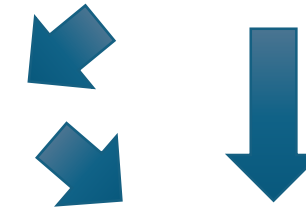


Metabolomica



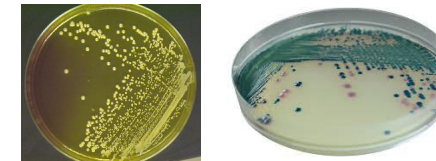
- **Campione clinico** (sangue, urina, escreato, liquor, essudati ...)

Arricchimento



- **Isolamento in coltura**

≥1 giorno



Antibiogramma fenotipico rapido
TAT: 2 - 6 h

Biochimica



MALDI-ToF

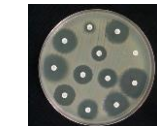


- **Identificazione**



≥1 giorno

- **Antibiogramma fenotipico**

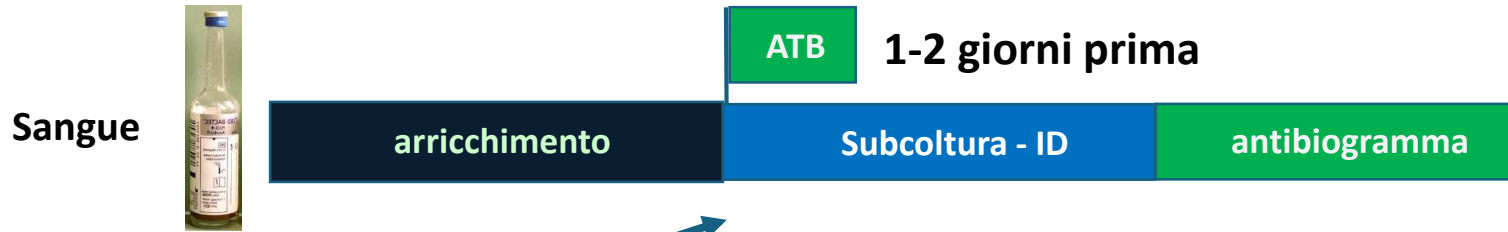


Diffusione



Diluizione

Antibiogramma fenotipico rapido



ANTIBIOGRAMMA FENOTIPICO RAPIDO

- *Imaging* avanzato
- Metabolomica
- Citofluorimetria
- *Single-cell nanomotion*

Vantaggi:

Rapidità

Limiti:

Solo da emocolture positive (non da campione clinico)

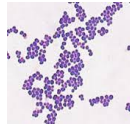
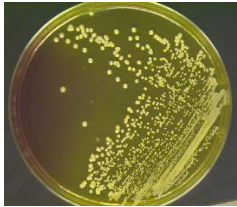
Solo con emocolture monomicrobiche

Validazione / composizione dei pannelli

EVOLUZIONE DELLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA

Fine-1800:
colture
isolanti

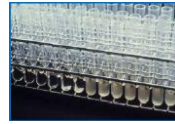
- Rilevazione patogeni mediante isolamento in COLTURA
- Identificazione e caratterizzazione fenotipica



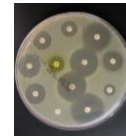
microscopia



Profilo
biochimico



Antibiogramma



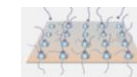
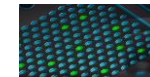
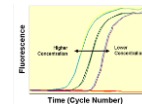
Proteomica



**NUOVE
TECNOLOGIE
FENOTIPICHE**



Fine-1900/2000:
analisi genotipica

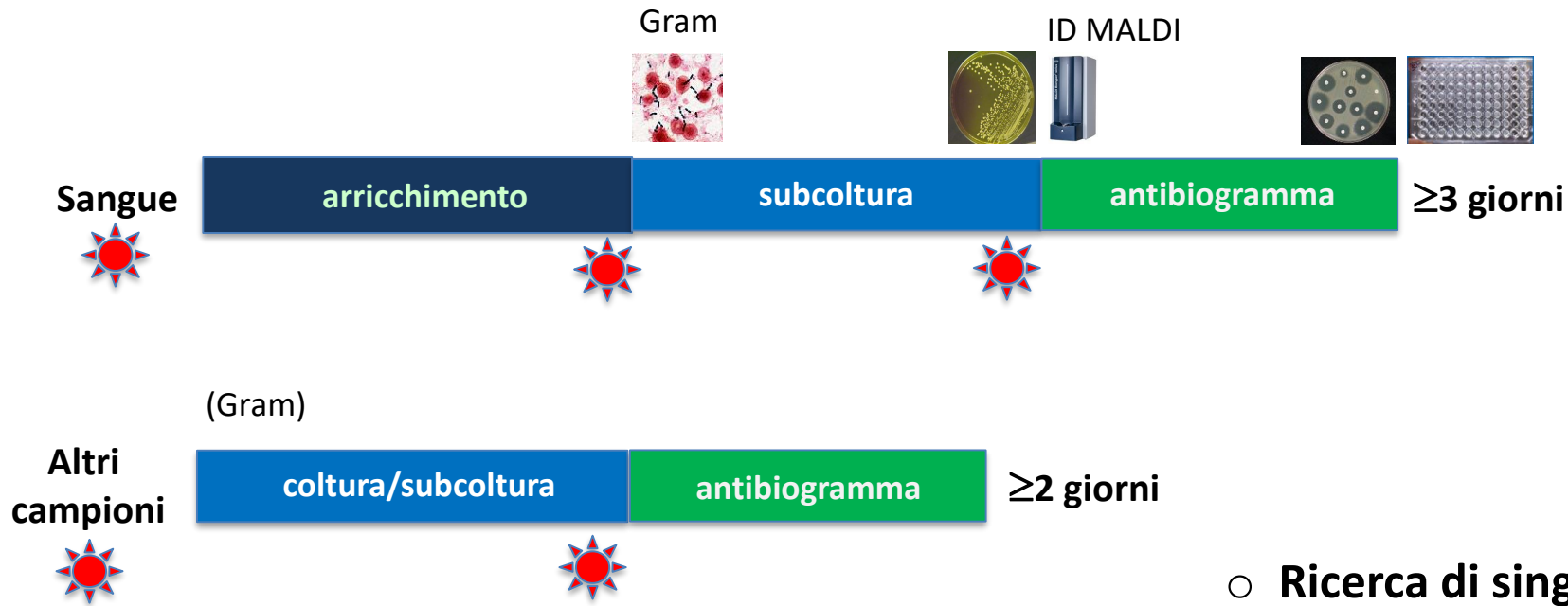


- Rilevazione patogeni e meccanismi di resistenza con ANALISI MOLECOLARI DIRETTE (NAAT, sequenziamento ...)

Diagnostica microbiologica molecolare

Ricerca **marcatori molecolari**:

- di patogeni microbici
- di meccanismi di resistenza



- Può essere rapida
- Anche direttamente da emo positiva e campione clinico
- Rileva anche patogeni *fastidious* / non coltiv.
- Automazione (possibile *near patient*)

- Ricerca di singoli *target*
- Ricerca di più *target* con pannelli sindromici

Posizionamento della diagnostica molecolare nel percorso analitico

Esempio di pannello molecolare sindromico per polmonite

<u>Bacterial Targets:</u> <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> complex <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> group <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	<u>Atypical Bacterial:</u> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <u>Viruses:</u> Adenovirus Coronavirus Human Metapneumovirus Human Rhinovirus/Enterovirus Influenza A Influenza B Parainfluenza Virus Respiratory Syncytial Virus	<u>Antimicrobial Resistance Genes:</u> CTX-M (ESBL; resistance to specific classes of beta lactam antibiotics) IMP (Carbapenem resistance) KPC (Carbapenem resistance) mecA/C and MREJ (Methicillin resistance) NDM (Carbapenem resistance) Oxa48-like (Carbapenem resistance) VIM (Carbapenem resistance)
--	---	---

Campione: BAL, BAS/TAS

TAT: 75 min

**Meccanismi di resistenza
 clinicamente rilevanti
(antibiogramma molecolare)**

Batteri, batteri atipici, virus

Fast multiplex bacterial PCR of bronchoalveolar lavage for antibiotic stewardship in hospitalised patients with pneumonia at risk of Gram-negative bacterial infection (Flagship II): a multicentre, randomised controlled trial

Lancet Respir Med 2022; 10:877

Andrei M Darie, Nina Khanna, Kathleen Jahn, Michael Osthoff, Stefano Bassetti, Mirjam Osthoff, Desiree M Schumann, Werner C Albrich, Hans Hirsch, Martin Brutsche, Leticia Grize, Michael Tamm, Daiana Stolz

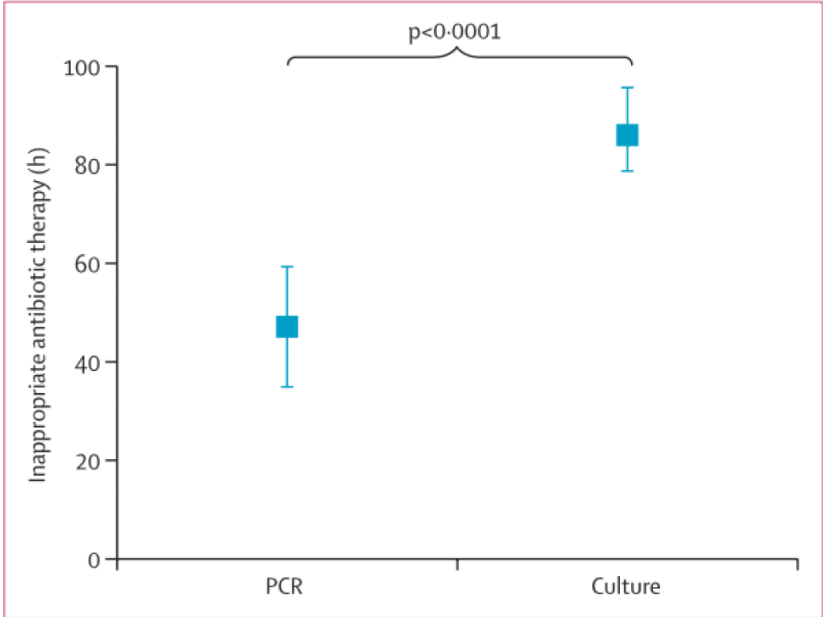
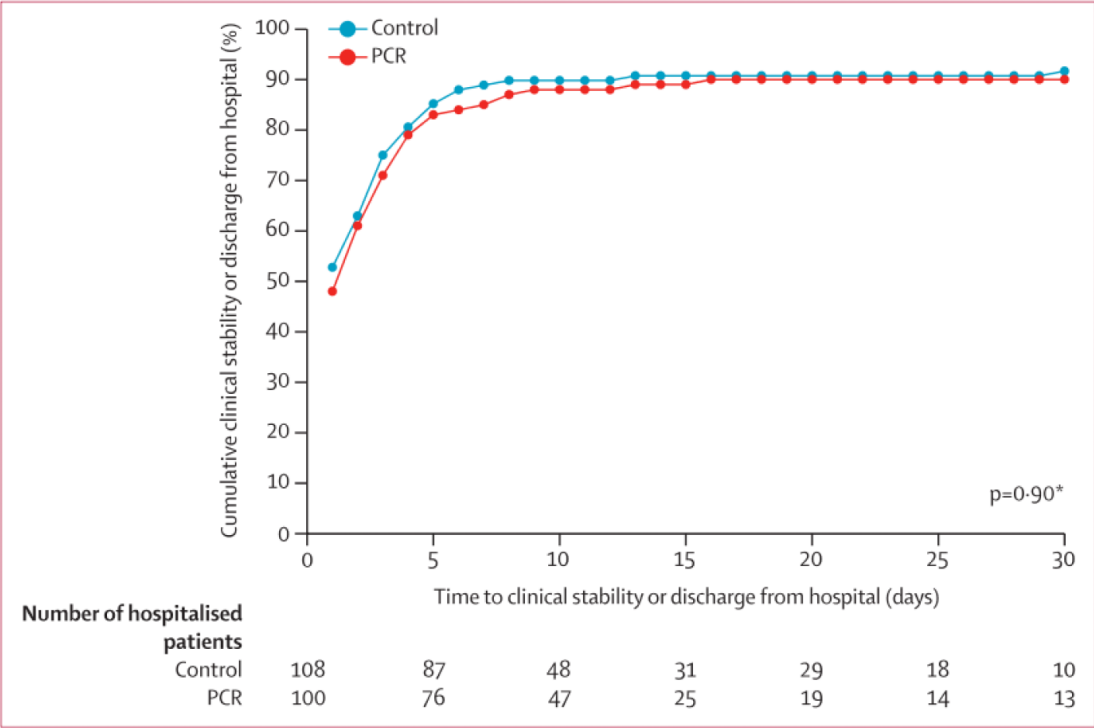


Figure 2: Duration of inappropriate antibiotic therapy
Bars indicate 95% CIs.

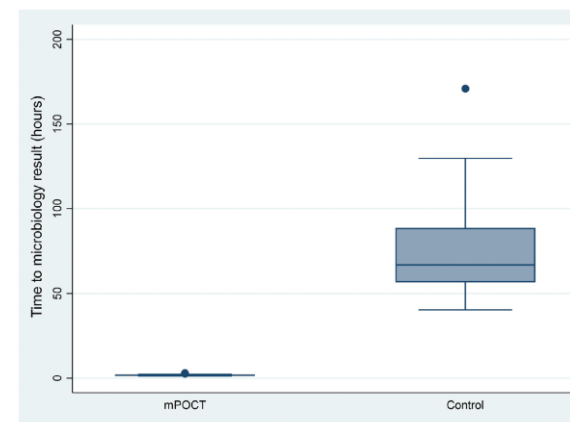




Molecular point-of-care testing for lower respiratory tract pathogens improves safe antibiotic de-escalation in patients with pneumonia in the ICU: Results of a randomised controlled trial

Stephen Poole^{a,b,*}, Alex R Tanner^b, Vasanth V Naidu^b, Florina Borca^{a,c}, Hang Phan^c, Kordo Saeed^{b,d}, Michael P W Grocott^{a,d,e}, Ahilanandan Dushianthan^{a,d,e}, Helen Moyses^a, Tristan W Clark^{a,b,d,f}

Clinical and safety outcomes.



Outcome	mPOCT group <i>n</i> = 100	Control group <i>n</i> = 100	Absolute difference (95%CI)	p value
30-day mortality	18/99 (18)	16/96 (17)	2% (-9 to 12)	0.78
60-day mortality	20/99 (20)	21/96 (22)	-2% (-13 to 10)	0.77
Time to hospital discharge from recruitment, days*	21.2 [10.3–37.0]	18.2 [11.3–36.0]	3.0 (-4.5 to 10.5)	0.43
Time to critical care discharge from recruitment, days†	10.0 [3.2–16.3]	7.1 [4.0–14.0]	2.8 (-0.7 to 6.3)	0.11
NIV after recruitment	37/91 (41)	29 /93 (31)	9% (-4 to 23)	0.18
Duration on NIV, days‡	1.8 [0.6–3.9]	2.5 [0.8–4.5]	-0.7 (-2.5 to 1.1)	0.44
Invasive ventilation after recruitment	60/92 (65)	66/94 (70)	-5% (-18 to 8)	0.47
Duration on invasive ventilation, days§	7.5 [4.5–15.1]	6.7 [2.7–12.8]	1.0 (-2.7 to 4.7)	0.59
Oxygen therapy	84/94 (89)	86/94 (91)	-2% (-11 to 6)	0.62
Duration of oxygen therapy, days¶	10.5 [4.6–17.5]	6.0 [3.0–14.1]	4.7 (1.1 to 8.3)	0.010
Inotropic/vasopressor support after recruitment	42/94 (45)	47/94 (50)	-5% (-20 to 9)	0.47
Duration on inotropes/vasopressors, days**	7.2 [3.7–12.1]	5.3 [3.4–13.6]	2.3 (-1.7 to 6.3)	0.26
Antimicrobial adverse drug reaction within 30 days	1/99 (1)	3/100 (3)	-2% (-6 to 2)	0.34
New <i>Clostridioides difficile</i> infection within 30 days	0/99 (0)	1/100 (1)	N/A	N/A

All data are presented as *n* (%) and median [IQR]. mPOCT, molecular point-of-care testing. CI, confidence interval. NIV, non-invasive ventilation.

- Ampiezza dei pannelli limitata **pannello molecolare sindromico per polmonite**

Mancano:
SARS-CoV-2
HSV, VZV, CMV
S. maltophilia
Bordetella
Burkholderia
Achromobacter
C. psittaci
Aspergillus
Pneumocystis
...

<u>Bacterial Targets:</u> <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> complex <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> group <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	<u>Atypical Bacterial:</u> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<u>Antimicrobial Resistance Genes:</u> CTX-M (ESBL; resistance to specific classes of beta lactam antibiotics) IMP (Carbapenem resistance) KPC (Carbapenem resistance) mecA/C and MREJ (Methicillin resistance) NDM (Carbapenem resistance) Oxa48-like (Carbapenem resistance) VIM (Carbapenem resistance)
	<u>Viruses:</u> Adenovirus Coronavirus Human Metapneumovirus Human Rhinovirus/Enterovirus Influenza A Influenza B Parainfluenza Virus Respiratory Syncytial Virus	

Mancano:
GES, PER, VEB
CMY, DHA
Rmt, ArmA
Sul, DHFR
...

Diagnostica microbiologica molecolare

limiti degli attuali pannelli sindromici

- Ampiezza dei pannelli limitata

pannello molecolare sindromico per BSI

Candida albicans
Candida tropicalis
Candida krusei
Candida glabrata
Candida parapsilosis

E. faecium
S. aureus
K. pneumoniae
A. baumannii
P. aeruginosa
E. coli

Gram-negative marker

KPC
OXA-48 Group
NDM /VIM/IMP
CTX-M 14/15
AmpC(CMY/DHA)

Gram-positive marker

vanA/B
mecA/C



mPCR + NMR

- **Pannelli piccoli**
- **TAT 3-5 hrs**
- **Costo elevato**
- **Non quantifica**

Diagnostica microbiologica molecolare

evoluzioni dei pannelli sindromici

○ Pannelli sindromici XR *ultrafast* da sangue

deepull

UllCORE BSI Test

deepull is developing the UllCORE BSI Test for 8 mL of whole blood from patients with suspected infection or sepsis. Preliminary results based on prospectively obtained specimens from septic patients show:

- High concordance with positive blood culture
- Detection of more than twice as many clinically relevant pathogens compared to blood culture

~1 hr
Turnaround time

Gram positive

Staphylococcus spp. (52 species)
S. aureus
S. epidermidis
S. lugdunensis
Streptococcus spp. (86 species)
S. agalactiae (Group B)
S. pneumoniae
S. pyogenes
E. faecalis
E. faecium
L. monocytogenes
B. cereus

ABx resistance

mecA/C
MREJ
vanA/B

Fungi

C. albicans
C. auris
C. glabrata
C. krusei
C. parapsilosis
C. tropicalis
C. neoformans/gattii

Gram negative

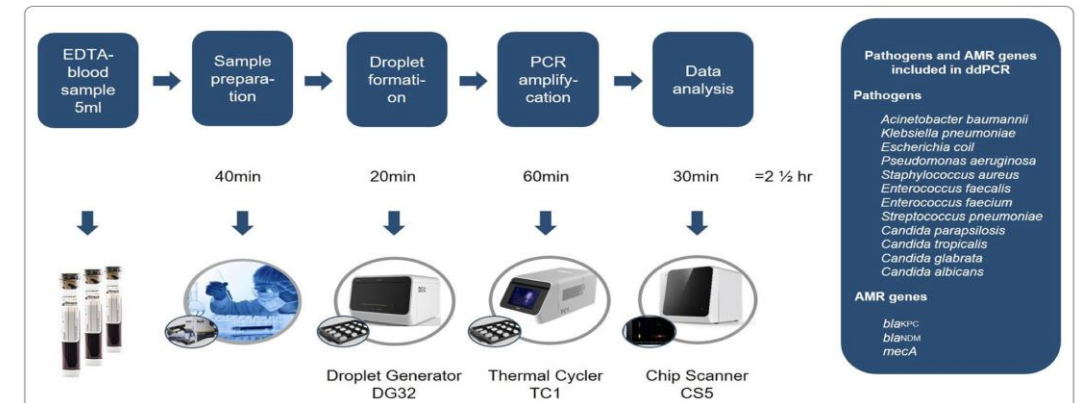
Enterobacteriales pan (98 species)
E. cloacae complex
E. coli
K. aerogenes
K. oxytoca
K. pneumoniae group
Proteus spp.
Salmonella spp.
S. marcescens group
A. calcoaceticus-baumannii complex
B. fragilis
H. influenzae
N. meningitidis (encapsulated)
P. aeruginosa
S. maltophilia
F. necrophorum
F. nucleatum
V. vulnificus
C. jejuni
P. multocida

ABx resistance

CTX-M VIM
IMP OXA-48
KPC OXA-40
mcr-1 OXA-23
NDM

Product under development. Not currently available for diagnostic use.

○ Pannelli sindromici con quantificazione patogeni nel sangue (ddPCR)



ANTIBIOGRAMMA MOLECOLARE

Rilevazione rapida di meccanismi di resistenza
a livello molecolare (geni di resistenza)



Inferenza del profilo di sensibilità/resistenza
del patogeno



Informazione *actionable* ai fini di *stewardship*
terapeutica ed IPC

ANTIBIOGRAMMA MOLECOLARE: *CHALLENGES*

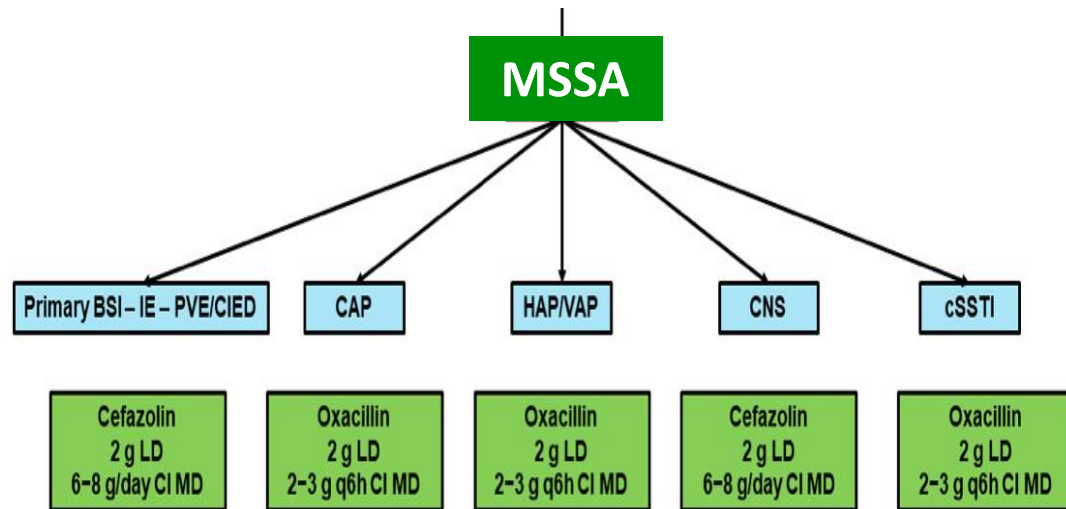
- Gli attuali pannelli sindromici coprono solo alcuni meccanismi di resistenza
- L'interpretazione dei risultati non è attualmente standardizzata (non riporta valori di MIC interpretabili con il sistema dei *breakpoints* clinici)
- La predittività può essere variabile e l'interpretazione inferenziale dei risultati può essere complessa

Antibiogramma molecolare e *stewardship* terapeutica: il caso di *Staphylococcus aureus* e geni *mec*

Staphylococcus aureus:
RILEVATO

Antibiogramma genotipico

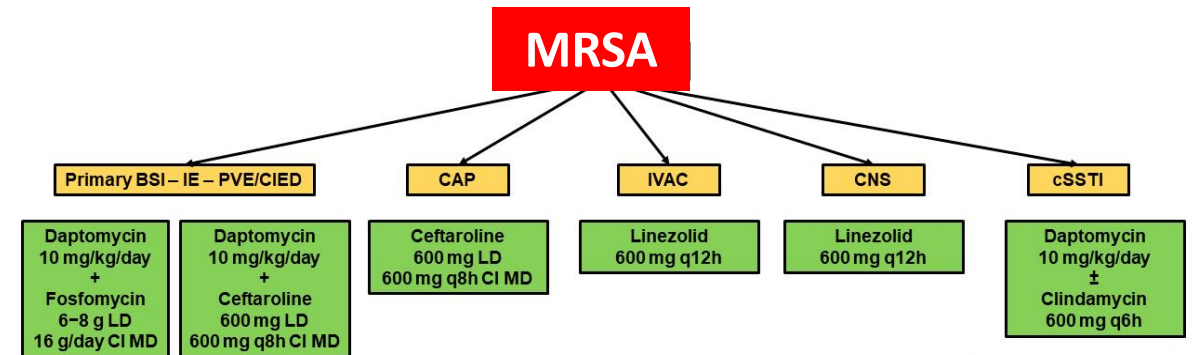
MecA/C MREJ non rilevato



Staphylococcus aureus:
RILEVATO

Antibiogramma genotipico

MecA/C MREJ **RILEVATO**



Antibiogramma molecolare e *stewardship* terapeutica per nuovi anti-Gram-negativi

Spettro di attività

Più comuni patogeni MDR	CZA	MEV	IMR	FDC	AZA	SDU	FPN
Enterobatteri ESBL	+	+	+	+	+	NO	+
Enterobatteri KPC	+	+	+	+	+	NO	NO
Enterobatteri OXA-48	+	NO	NO	+	+	NO	+
Enterobatteri MBL	NO	NO	NO	+	+	NO	NO
<i>Pseudomonas</i> MBL	NO	NO	NO	+	?	NO	NO
<i>Acinetobacter</i> OXA	NO	NO	NO	?	NO	+	NO
<i>Acinetobacter</i> MBL	NO	NO	NO	?	NO	NO	NO

CZA = ceftazidime/avibactam

MEV = meropenem/vaborbactam

IMR = imipenem/relebactam

FDC = cefiderocol

AZA = aztreonam/avibactam

SDU = sulbactam/durlobactam

FPN = cefepime/enmetazobactam

ID: *Klebsiella pneumoniae*

Antibiogramma molecolare:

CTX-M	Non rilevato
KPC	RILEVATO
OXA-48	Non rilevato
IMP	Non rilevato
VIM	Non rilevato
NDM	Non rilevato

CTX-M	RILEVATO
KPC	Non rilevato
OXA-48	Non rilevato
IMP	Non rilevato
VIM	Non rilevato
NDM	RILEVATO

Antibiotico	Sensibilità/resistenza presuntiva
Ceftazidime	R molto probabile
Cefepime	R molto probabile
Amoxi/Clavul	R molto probabile
Pip/Tazob	R molto probabile
Ceftol/Tazob	R molto probabile
Ertapenem	R molto probabile
Meropenem	R molto probabile
Aztreonam	R molto probabile
Ceftaz/Avib	S molto probabile
Mero/Vaborb	S molto probabile
Imip/Releb	S molto probabile
Cefiderocol	S molto probabile
Aztreonam/Avib	S molto probabile

Antibiotico	Sensibilità/resistenza presuntiva
Ceftazidime	R molto probabile
Cefepime	R molto probabile
Amoxi/Clavul	R molto probabile
Pip/Tazob	R molto probabile
Ceftol/Tazob	R molto probabile
Ertapenem	R molto probabile
Meropenem	R molto probabile
Aztreonam	R molto probabile
Ceftaz/Avib	R molto probabile
Mero/Vaborb	R molto probabile
Imip/Releb	R molto probabile
Cefiderocol	S molto probabile
Aztreonam/Avib	S molto probabile

Antibiogramma molecolare e *stewardship* terapeutica per nuovi anti-Gram-negativi

Spettro di attività **! resistenze emergenti**

Più comuni patogeni MDR	CZA	MEV	IMR	FDC	AZA	SDU	FPN
Enterobatteri ESBL	+	+	+	+	+	NO	+
Enterobatteri KPC	+!!	+!	+!	+!	+	NO	NO
Enterobatteri OXA-48	+	NO	NO	+	+	NO	+
Enterobatteri MBL	NO	NO	NO	+!!	+	NO	NO
<i>Pseudomonas</i> MBL	NO	NO	NO	+	?	NO	NO
<i>Acinetobacter</i> OXA	NO	NO	NO	?	NO	+	NO
<i>Acinetobacter</i> MBL	NO	NO	NO	?	NO	NO	NO

CZA = ceftazidime/avibactam

MEV = meropenem/vaborbactam

IMR = imipenem/relebactam

FDC = cefiderocol

AZA = aztreonam/avibactam

SDU = sulbactam/durlobactam

FPN = cefepime/enmetazobactam

Profili di sensibilità di *Klebsiella pneumoniae* KPC+ al test molecolare

Antibiogramma molecolare	
CTX-M	Non rilevato
KPC	RILEVATO
OXA-48	Non rilevato
IMP	Non rilevato
VIM	Non rilevato
NDM	Non rilevato

Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Meropenem	64 R
CAZ-Avib	1 S
MER-Vabor	0.25 S
IMI-Releb	0.5 S
Cefiderocol	1 S

KPC-3

Antibiogramma molecolare	
CTX-M	Non rilevato
KPC	RILEVATO
OXA-48	Non rilevato
IMP	Non rilevato
VIM	Non rilevato
NDM	Non rilevato

Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Meropenem	1 S
CAZ-Avib	>32 R
MER-Vabor	0.25 S
IMI-Releb	0.5 S
Cefiderocol	4 R

KPC-31

Antibiogramma molecolare	
CTX-M	Non rilevato
KPC	RILEVATO
OXA-48	Non rilevato
IMP	Non rilevato
VIM	Non rilevato
NDM	Non rilevato

Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Meropenem	32 R
CAZ-Avib	>32 R
MER-Vabor	8 S
IMI-Releb	0.5 S
Cefiderocol	4 R

KPC-109

Antibiogramma molecolare	
CTX-M	Non rilevato
KPC	RILEVATO
OXA-48	Non rilevato
IMP	Non rilevato
VIM	Non rilevato
NDM	Non rilevato

Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Meropenem	32 R
CAZ-Avib	>32 R
MER-Vabor	>32 R
IMI-Releb	>16 R
Cefiderocol	4 R

KPC-3 iperprodotta

I pannelli sindromici attuali non distinguono le varianti KPC e gli iperproduttori di KPC ...

Profili di sensibilità di *Klebsiella pneumoniae* NDM+ al test molecolare

Antibiogramma molecolare	
CTX-M	RILEVATO
KPC	Non rilevato
OXA-48	Non rilevato
IMP	Non rilevato
VIM	Non rilevato
NDM	RILEVATO

Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Meropenem	>64 R
CAZ-Avib	>32 R
MER-Vabor	>32 R
IMI-Releb	>16 R
Cefiderocol	1 S

NDM-1

Antibiogramma molecolare	
CTX-M	RILEVATO
KPC	Non rilevato
OXA-48	Non rilevato
IMP	Non rilevato
VIM	Non rilevato
NDM	RILEVATO

Antibiotico	MIC mg/L (S/I/R)
Meropenem	>64
CAZ-Avib	>32 R
MER-Vabor	>32 R
IMI-Releb	>16 R
Cefiderocol	64 R

NDM-1, ΔCirA

I pannelli sindromici attuali non distinguono i mutanti dei recettori dei siderofori ...

Conclusioni

- Contributo essenziale della diagnostica microbiologica per *stewardship* terapeutica IPC e sorveglianza microbiologica
- Diagnostica colturale: ancora riferimento (ma con alcuni limiti)
- Nuove tecnologie molecolari in diagnostica microbiologica: vantaggi per rapidità e sensibilità (ma con alcuni limiti)
- Complessità interpretative crescenti: necessità di competenze specialistiche
- Necessità di revisioni organizzative
- Necessità di ulteriori avanzamenti nel settore della diagnostica microbiologica, e di ulteriori valutazioni dell'impatto clinico delle nuove tecnologie diagnostiche