# Diagnostica microbiologica e corretto impiego dei test




**Gian Maria Rossolini**

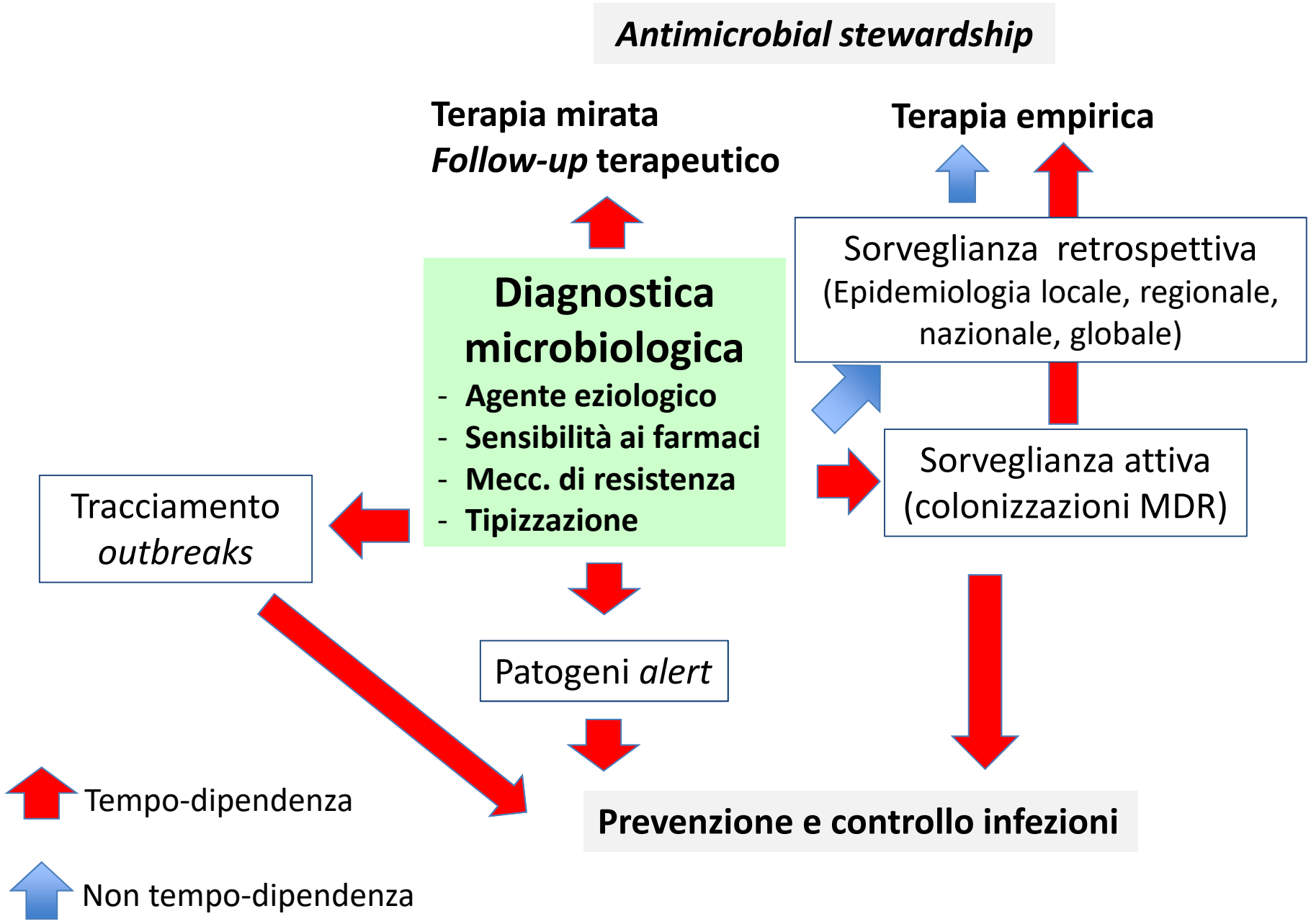
**Dip. Medicina Sperimentale e Clinica**

**Università di Firenze**

**SOD Microbiologia e Virologia**

**AOU 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, 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, Viatris


Antimicrobial stewardship
Terapia mirata
Follow-up terapeutico
Terapia empirica
Diagnostica microbiologica
- Agente eziologico
- Sensibilità ai farmaci
- Mecc. di resistenza
- Tipizzazione
Sorveglianza retrospettiva (Epidemiologia locale, regionale, nazionale, globale)
Sorveglianza attiva (colonizzazioni MDR)
Tracciamento outbreaks
Patogeni alert
Prevenzione e controllo infezioni
Tempo-dipendenza
Non tempo-dipendenza

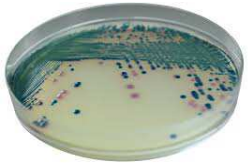
## Esame colturale con antibiogramma fenotipico: il riferimento nella diagnostica microbiologica

- Altamente standardizzato
- Permette studio degli isolati
- Antibiogramma fenotipico ampiamente validato come *proxy* per predizione efficacia clinica

- Lentezza (≥2 giorni)
- Alcuni patogeni difficilmente / non coltivabili
- Analisi di popolazione microbica limitata

**S, sensibile a dosaggio standard**
**I, sensibile, esposizione aumentata**
**R, resistente**

- **isolamento in coltura**

**≥1 giorno**

- **identificazione**


Biochimica


MALDI-ToF

- **antibiogramma fenotipico: MIC – aloni di inibizione tradotti in categoria (S/I/R)**




**≥1 giorno**

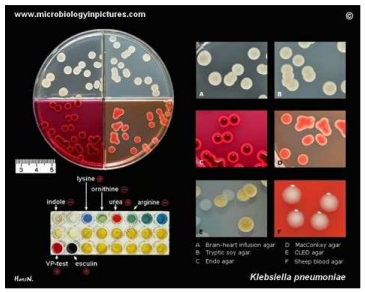
# Evoluzione tecnologica della diagnostica microbiologica



Microscopia



Culture isolanti



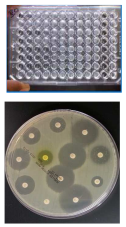

ID biochimica



Emocolture automatizzate



MALDI

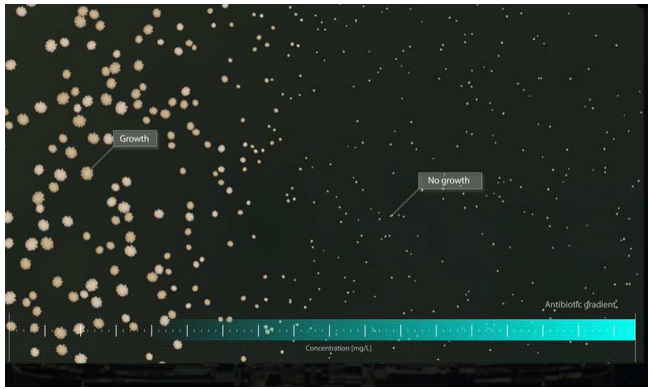


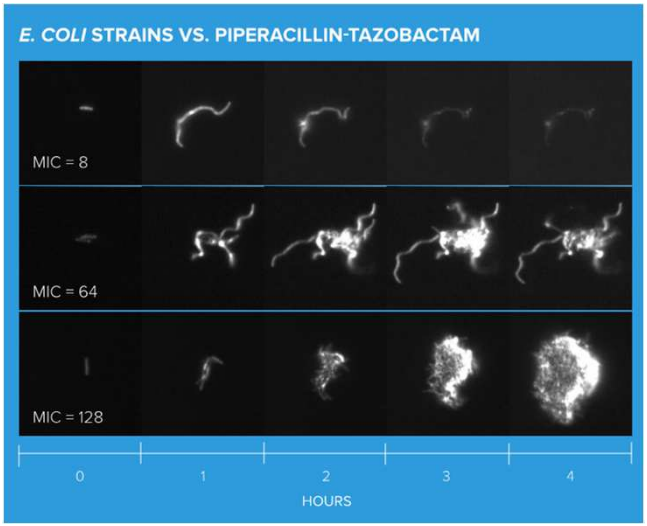
Antibiogramma fenotipico

**Diagnostiche rapide**

**Antibiogramma fenotipico rapido**

1880 1950 1970 2000

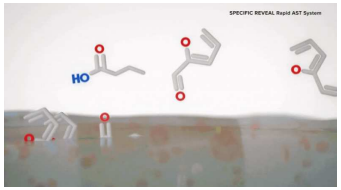


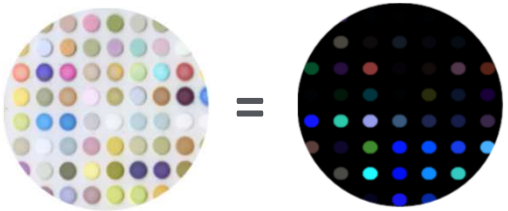




## ANTIBIOGRAMMA FENOTIPICO RAPIDO

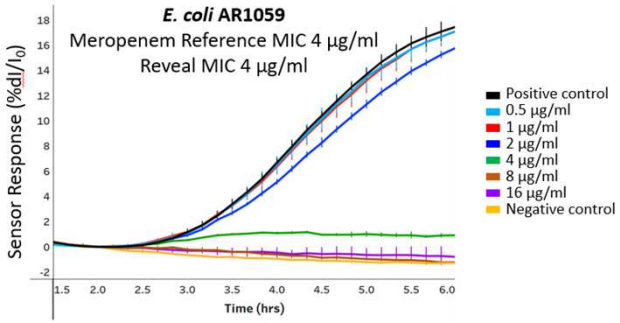
- *Imaging* avanzato
- Metabolomica

## Tempi di risposta: 2,5 - 6 h





# Sepsi, post-chirurgia addominale

ID MALDI (+6 h) ***K. pneumoniae***

**Sangue**



**12 h**

Gram (+2 h)



**Arricchimento** | **ID/AFR**

**bacilli Gram-**

EMPIRICA

**Meropenem**
**Linezolid**

**REVISIONE PRECOCE (1-2 giorni prima)**



Antibiogramma fenotipico rapido (+6 h)

| Antibiotico | MIC mg/L (S/I/R) |
|---|---|
| Amoxi-Clav | >16 R |
| Pipera-Tazob | >16 R |
| Cefotaxime | >64 R |
| Ceftazidime | >64 R |
| Cefepime | >64 R |
| Imipenem | >8 R |
| Meropenem | >8 R |
| Ceftol-Tazob | >4 R |
| Amikacina | ≤4 (S) |
| Gentamicina | ≤1 (S) |
| Ciprofloxacina | >1 R |
| Ceftaz-Avib | 0.5 S |
| Mero-Vabor | 0.25 S |
| Co-trimossazolo | >4/76 R |

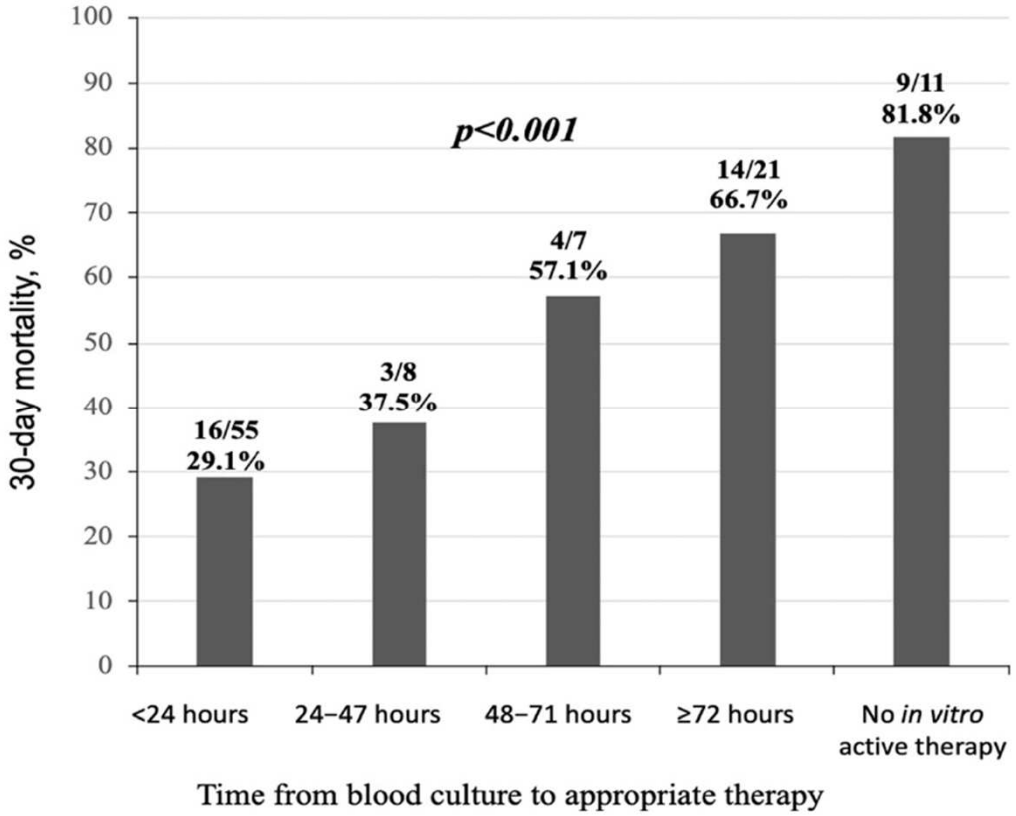
Falcone *et al. Critical Care* (2020) 24:29
https://doi.org/10.1186/s13054-020-2742-9

Critical Care

RESEARCH Open Access

# Time to appropriate antibiotic therapy is a predictor of outcome in patients with bloodstream infection caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*

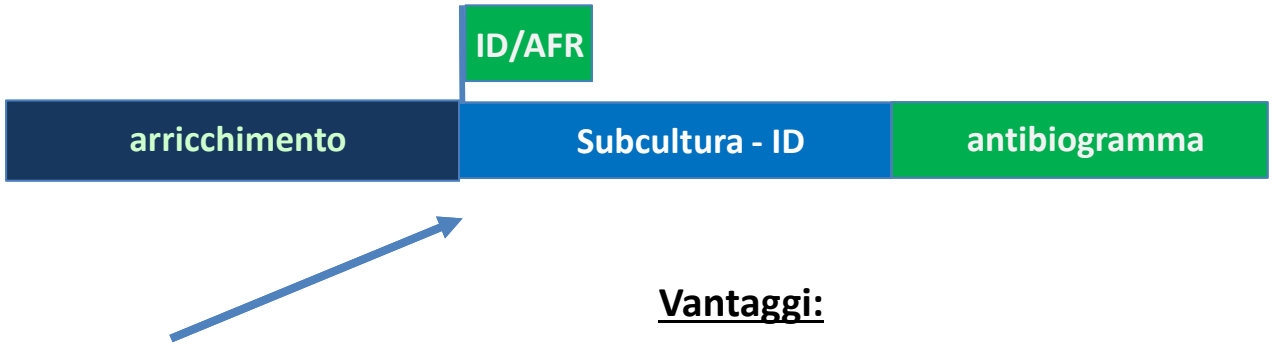
Marco Falcone[1*], Matteo Bassetti[2], Giusy Tiseo[1], Cesira Giordano[3], Elia Nencini[4], Alessandro Russo[1], Elena Graziano[5], Enrico Tagliaferri[1], Alessandro Leonildi[3], Simona Barnini[3], Alessio Farcomeni[6] and Francesco Menichetti[1]



# Antibiogramma fenotipico rapido nel percorso delle emocolture

Sangue
(altri liquidi)






**ANTIBIOGRAMMA FENOTIPICO RAPIDO**

- *Imaging* avanzato
- Metabolomica

**Tempi di risposta: 2,5 - 6 h**

**Vantaggi:**

- **Rapidità**
- **Informazione convenzionale (MIC, S/I/R)**
- **Può sostituire percorso tradizionale**

**Limiti:**

- ***Non eseguibile da campione clinico***
- ***Solo colture monomicrobiche***
- ***Costo elevato***
- ***Composizione dei pannelli limitata***

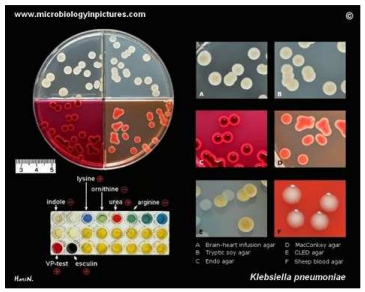
# Evoluzione tecnologica della diagnostica microbiologica



Microscopia



Culture isolanti



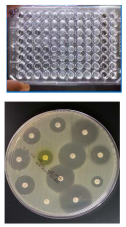

ID biochimica



Emocolture automatizzate



MALDI



Antibiogramma fenotipico

**Diagnostiche rapide**

- Antibiogramma fenotipico rapido
- LFIA per meccanismi R

1880 1950 1970 2000

# Lateral Flow Immuno Assay (LFIA)




Es. ricerca di carbapenemasi:
KPC
OXA-48-like
VIM
NDM
OXA-23

**Tempi di risposta: 15 - 30 min**



**Sangue**

**arricchimento** | **Subcoltura - ID** | **antibiogramma** **≥3 gg**

**arricchimento** | **Subcult. Breve - ID** | **antibiogramma** **≥2 gg**




**Altri campioni**

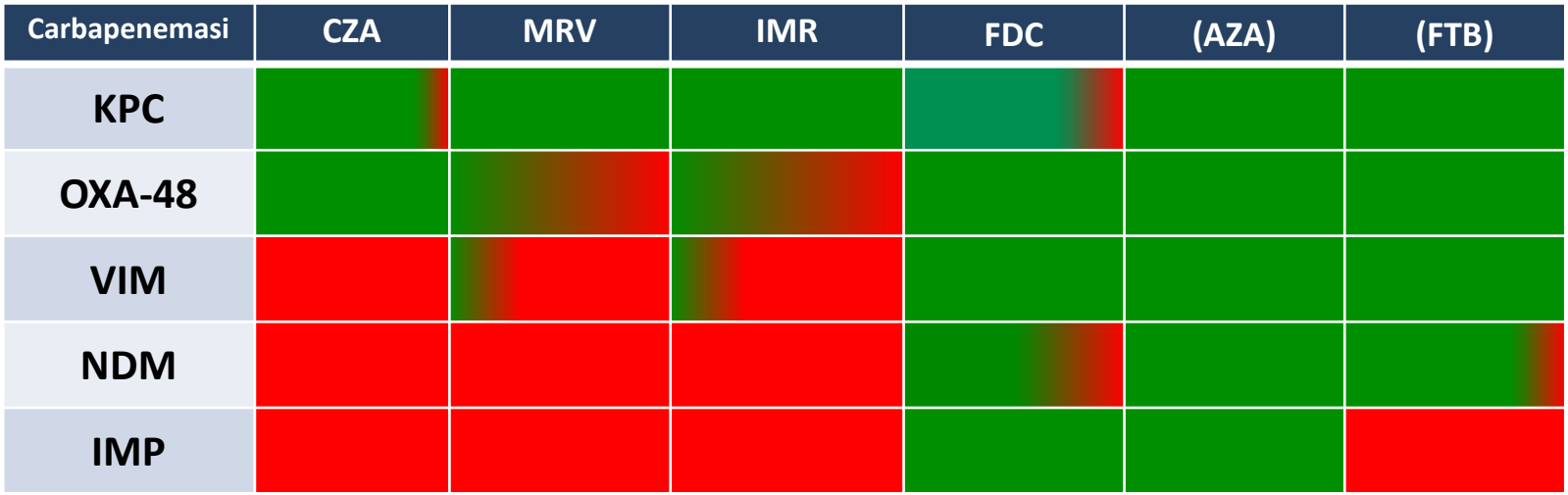
**cultura** | **antibiogramma** **≥2 giorni**

(subcultura)

**INFORMAZIONE DIVERSA da antibiogramma fenotipico**

**Inferenza di probabile profilo di R o S**

# Attività dei nuovi antibiotici nei confronti di produttori di carbapenemasi




CZA = ceftazidime/avibactam
MRV = meropenem/vaborbactam
IMR = imipenem/relebactam
FDC = cefiderocol
AZA = aztreonam/avibactam
FTB = cefepime/taniborbactam

Yahav *et al* – Clin Micro Rev 2021
Kaye *et al* – Infect Dis Ther 2023

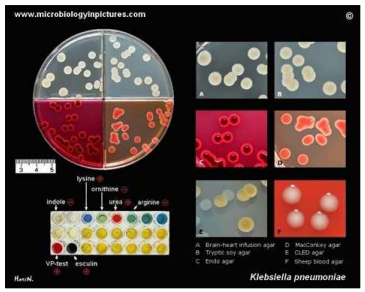
# Evoluzione tecnologica della diagnostica microbiologica



Microscopia



Culture isolanti




ID biochimica



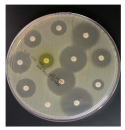
Emocolture automatizzate



MALDI







Antibiogramma fenotipico

**Diagnostiche rapide**

- Antibiogramma fenotipico rapido
- LFIA per meccanismi R
- Pannelli molecolari sindromici



1880 1950 1970 2000

# Esempio di pannello molecolare sindromico per polmoniti

Campione: BAL, BAS/TAS **TTR: 70 min**

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

**Principali batteri, batteri atipici e virus causa di polmonite**

**Geni di resistenza (antibiogramma genotipico)**

**INFORMAZIONE DIVERSA rispetto ad antibiogramma fenotipico**

**Inferenza di probabile profilo di R o S**

**No MIC**

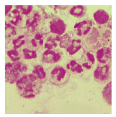
Riccobono *et al* – Exp Rev Mol Diagn 2022

## VAP, ICU neurochirurgica …

Empirica:

**Meropenem**
**Linezolid**

Gram (+2 h)



**PMN**
**Bacilli Gram-**

BAL



**Pannello molecolare sindromico**

(+2 h)

**Revisione precoce**

**ID molecolare:**

***P. aeruginosa*, $10^6$ GC/ml**

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

*Interpretazione:*

**PROBABILE RESISTENZA A:**

- PIPERACILLINA-TAZOBACTAM
- CEFTAZIDIME
- CEFEPIME
- IMIPENEM
- MEROPENEM
- CEFTOLOZANO-TAZOBACTAM
- CEFTAZIDIME-AVIBACTAM
- MEROPENEM-VABORBACTAM
- IMIPENEM-RELEBACTAM

**PROBABILE SENSIBILITA' A:**

- CEFIDEROCOL

**PREVISIONI NON POSSIBILI SU:**

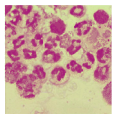
- COLISTINA
- AMINOGLICOSIDI
- FLUOROCHINOLONI
- AZTREONAM

## VAP, ICU neurochirurgica …

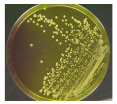
Empirica:

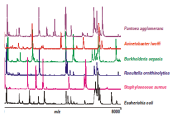
**Meropenem**
**Linezolid**

Gram (+2 h)



**PMN**
**Bacilli Gram-**





ID MALDI (40 h) ***P. aeruginosa*, $10^5$ CFU/ml**

BAL



**Cultura** | **Antibiogramma** (63 h)

**Revisione precoce**

**Pannello molecolare sindromico**

(+2 h)

**ID molecolare:**

***P. aeruginosa*, $10^6$ GC/ml**

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

| Antibiotico | MIC mg/L (S/I/R) |
|---|---|
| Pip-Tazob | >128 R |
| Cefepime | >16 R |
| Ceftazidime | >64 R |
| Meropenem | >32 R |
| Ceftol-Tazob | >32 R |
| Aztreonam | R (dd) |
| Ceftaz-Avib | >16 R |
| Mero-Vabor | >16 R |
| Cefiderocol | S disk |
| Fosfomicina | 128 |
| Amikacina | 4 (S) |
| Tobramicina | >4 R |
| Ciprofloxacina | >4 R |
| Colistina | 1 (S) |

Monard et al. Critical Care (2020) 24:434
https://doi.org/10.1186/s13054-020-03114-y

Critical Care

RESEARCH Open Access

# Multicenter evaluation of a syndromic rapid multiplex PCR test for early adaptation of antimicrobial therapy in adult patients with pneumonia

Céline Monard[1], Jonathan Pehlivan[2], Gabriel Auger[3,4], Sophie Alviset[5], Alexy Tran Dinh[6,7], Paul Duquaire[1], Nabil Gastli[8], Camille d'Humières[9,10], Adel Maamar[11,12], André Boibieux[13], Marion Baldeyrou[14], Julien Loubinoux[15], Olivier Dauwalder[16,17], Vincent Cattoir[3,18,19], Laurence Armand-Lefèvre[9,10], Solen Kernéis[5,10*] and the ADAPT study group

Potential for antibiotic adjustment based on molecular testing in 77% of pneumonia episodes (de-escalation, 40%)

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Journal of Clinical Microbiology®

2020

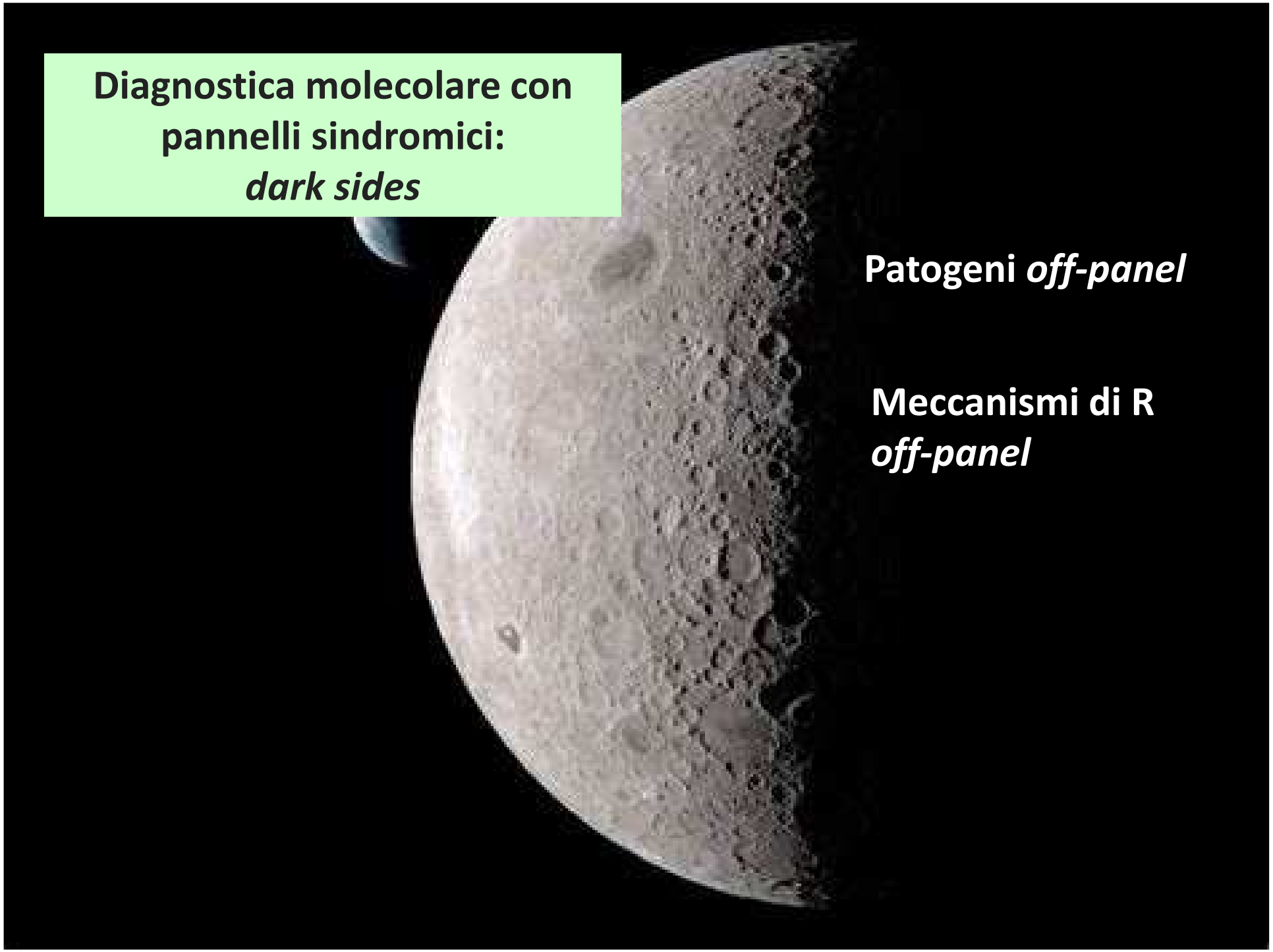
BACTERIOLOGY

# Practical Comparison of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel to Routine Diagnostic Methods and Potential Impact on Antimicrobial Stewardship in Adult Hospitalized Patients with Lower Respiratory Tract Infections

Blake W. Buchan,[a] Sam Windham,[a] Joan-Miquel Balada-Llasat,[b] Amy Leber,[c] Amanda Harrington,[d] Ryan Relich,[e] Caitlin Murphy,[f] Jennifer Dien Bard,[g] Samia Naccache,[g] Shira Ronen,[a] Amanda Hopp,[a] Derya Mahmutoglu,[a] Matthew L. Faron,[a] Nathan A. Ledeboer,[a] Amanda Carroll,[b] Hannah Stone,[b] Oluseun Akerele,[b] Kathy Everhart,[c] Andrew Bonwit,[d] Christina Kwong,[d] Rebecca Buckner,[e] Del Warren,[e] Randal Fowler,[f] Sukantha Chandrasekaran,[h] Holly Huse,[h] Shelley Campeau,[h*] Romney Humphries,[h*] Corrin Graue,[i] Angela Huang[a,j]

Potential for antibiotic adjustment based on molecular testing in 70% of pneumonia episodes (de-escalation, 48%)

**Diagnostica molecolare con pannelli sindromici:**
***dark sides***



**Patogeni *off-panel***

**Meccanismi di R *off-panel***

## Sepsi, medicina interna …

Test molecolare con pannello sindromico per BSI (+2 h)

Gram (+2 h)



**Sangue**



**50 h**

**Arricchimento**

**cocco-bacilli Gram-variab.**

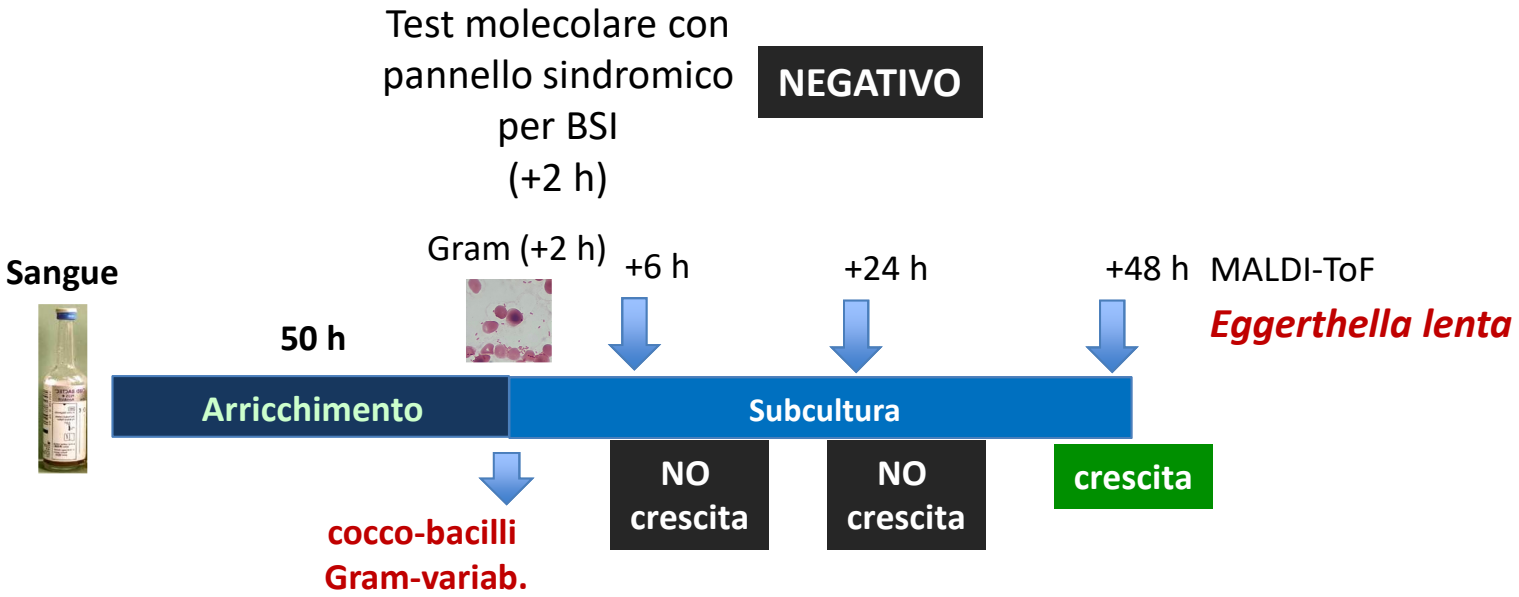
| Gram+ Bacteria | |
|---|---|
| *Enterococcus faecalis*<br>*Enterococcus faecium*<br>*Listeria monocytogenes*<br>*Staphylococcus*<br>*Staphylococcus aureus*<br>*Staphylococcus epidermidis*<br>*Staphylococcus lugdunensis*<br>*Streptococcus*<br>*Streptococcus agalactiae*<br>*Streptococcus pyogenes*<br>*Streptococcus pneumoniae* | **NON RILEVATI** |

| Gram– Bacteria | |
|---|---|
| *Acinetobacter calcoaceticus- baumannii complex*<br>*Bacteroides fragilis*<br>*Enterobacterales*<br>*Enterobacter cloacae complex*<br>*Escherichia coli*<br>*Klebsiella aerogenes*<br>*Klebsiella oxytoca*<br>*Klebsiella pneumoniae group*<br>*Proteus*<br>*Salmonella*<br>*Serratia marcescens*<br>*Haemophilus influenzae*<br>*Neisseria meningitidis*<br>*Pseudomonas aeruginosa*<br>*Stenotrophomonas maltophilia* | **NON RILEVATI** |

| Yeast | |
|---|---|
| *Candida albicans*<br>*Candida auris*<br>*Candida glabrata*<br>*Candida krusei*<br>*Candida parapsilosis*<br>*Candida tropicalis*<br>*Cryptococcus neoformans/gattii* | **NON RILEVATI** |

Di Pilato *et al* – data on file

## Sepsi, medicina interna …




Di Pilato *et al* – data on file

**Due casi di polmonite …**

Pannello sindromico per polmonite da BAL

ID molecolare:

***Klebsiella pneumoniae* group**

Antibiogramma genotipico:

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

Fenotipo atteso:

**PROBABILE RESISTENZA A:**
- VECCHI BLIC
- CEFALOSPORINE III-IV GENERAZ.
- CARBAPENEMI
- CEFTOLOZANO-TAZOBACTAM
- CEFTAZIDIME-AVIBACTAM
- MEROPENEM-VABORBACTAM
- IMIPENEM-RELEBACTAM

**PROBABILE SENSIBILITA A:**
- CEFIDEROCOL
- *AZTREONAM-AVIBACTAM*

**NON POSSIBILI PREVISIONI SU:**
- AMINOGLICOSIDI
- FLUOROCHINOLONI
- FOSFOMICINA
- COLISTINA
- COTRIMOSSAZOLO

Antibiogramma fenotipico sui ceppi isolati

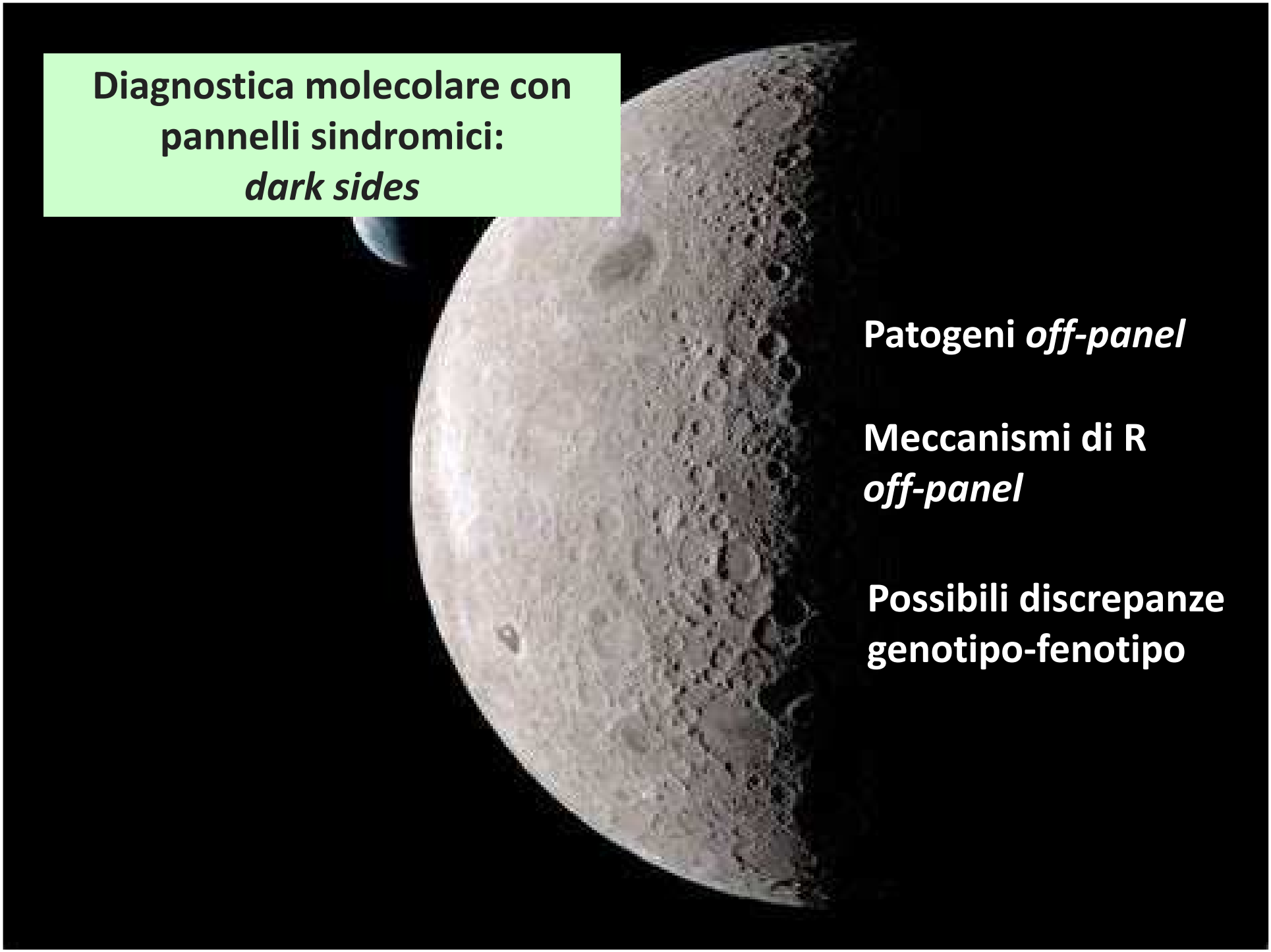
| Antibiotico | MIC mg/L (S/I/R) |
|---|---|
| Pip/Tazo | 128 R |
| Ceftazidime | >64 R |
| Cefepime | >16 R |
| Meropenem | >64 R |
| Ceftol/Tazob | >32 R |
| Fosfomicina | 16 S |
| Amikacina | >16 R |
| Gentamicina | >8 R |
| Ciprofloxacina | >4 R |
| Colistina | 1 (S) |
| Ceftaz-Avi | >32 R |
| Mero-Vab | >32 R |
| Imi-Rel | >16 R |
| Cefiderocol | 1 S |

**Caso 1 NDM-1**

| Antibiotico | MIC mg/L (S/I/R) |
|---|---|
| Pip/Tazo | 128 R |
| Ceftazidime | >64 R |
| Cefepime | >16 R |
| Meropenem | >64 R |
| Ceftol/Tazob | >32 R |
| Fosfomicina | 16 S |
| Amikacina | >16 R |
| Gentamicina | >8 R |
| Ciprofloxacina | >4 R |
| Colistina | 0.5 (S) |
| Ceftaz-Avi | >32 R |
| Mero-Vab | >32 R |
| Imi-Rel | >16 R |
| Cefiderocol | 64 R |

**Caso 2 NDM-1, ΔCirA**

# Diagnostica molecolare con pannelli sindromici: *dark sides*



Patogeni *off-panel*

Meccanismi di R *off-panel*

Possibili discrepanze genotipo-fenotipo

**Due casi di sepsi …**

Pannello sindromico per BSI da emocoltura positiva

ID molecolare:

***Klebsiella pneumoniae* group**

Antibiogramma genotipico:

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

Fenotipo atteso:

**PROBABILE RESISTENZA A:**
- VECCHI BLIC
- CEFALOSPORINE III-IV GENERAZ.
- CARBAPENEMI
- CEFTOLOZANO-TAZOBACTAM

**PROBABILE SENSIBILITA A:**
- CEFTAZIDIME-AVIBACTAM
- MEROPENEM-VABORBACTAM
- IMIPENEM-RELEBACTAM
- CEFIDEROCOL

**NON POSSIBILI PREVISIONI SU:**
- AMINOGLICOSIDI
- FLUOROCHINOLONI
- FOSFOMICINA
- COLISTINA
- COTRIMOSSAZOLO

Antibiogramma fenotipico sui ceppi isolati

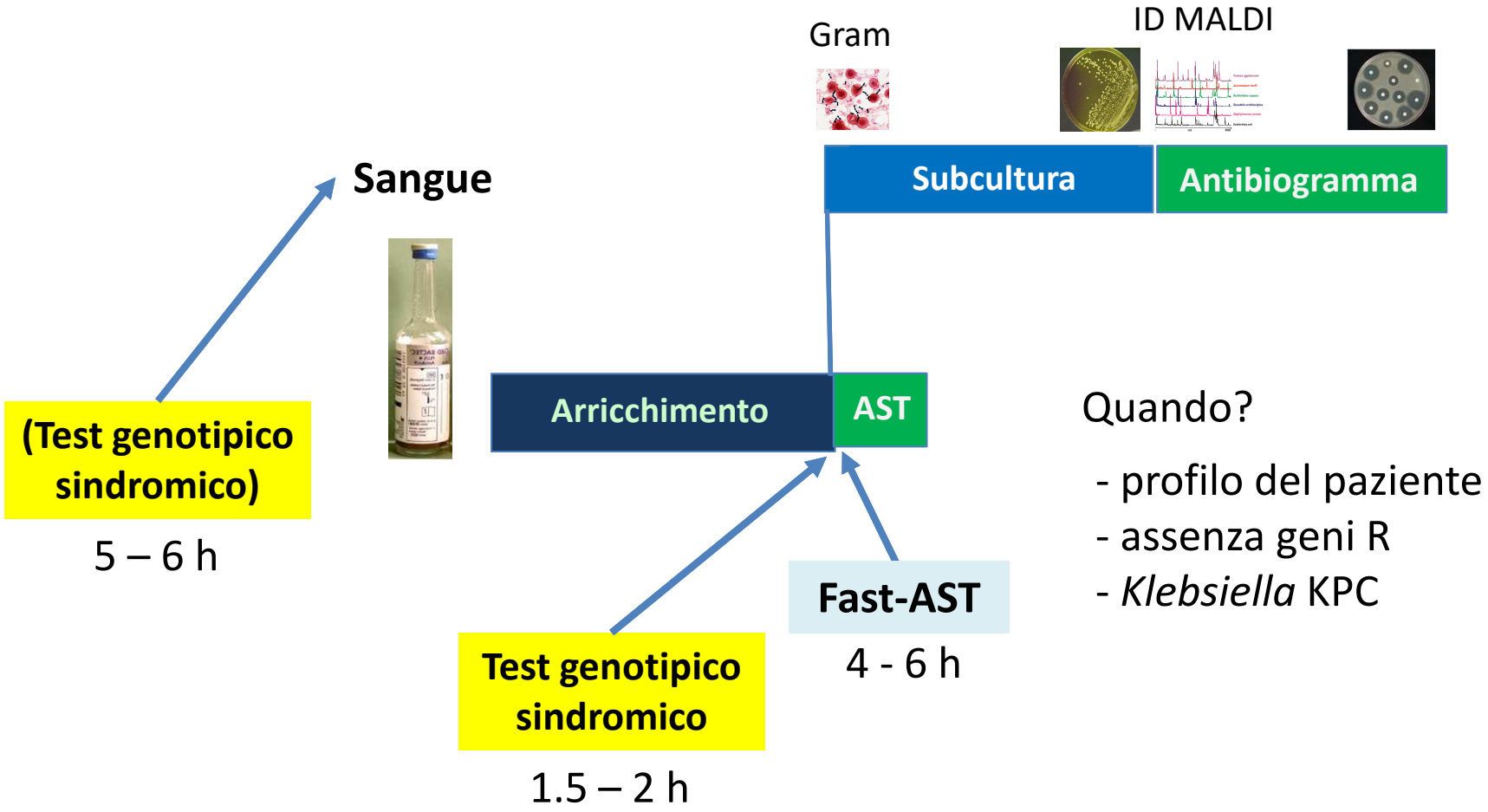
| Antibiotico | MIC mg/L (S/I/R) |
|---|---|
| Amoxi/Clav | >64 R |
| Pip/Tazo | >128 R |
| Ceftriaxone | >8 R |
| Ceftazidime | >128 R |
| Cefepime | >16 R |
| Meropenem | >64 R |
| Fosfomicina | 32 S |
| Amikacina | >16 R |
| Gentamicina | 1 (S) |
| Ciprofloxacina | >1 R |
| Colistina | 1 (S) |
| CAZ/AVI | 2 S |
| MER/VBR | 0.5 S |
| IMI/REL | 0.5 S |
| Cefiderocol | 1 S |

**Caso 1 KPC-3**

| Antibiotico | MIC mg/L (S/I/R) |
|---|---|
| Amoxi/Clav | >64 R |
| Pip/Tazo | >128R |
| Ceftriaxone | >8 R |
| Ceftazidime | >64 R |
| Cefepime | 32 R |
| Meropenem | 2 S |
| Fosfomicina | 32 S |
| Amikacina | 16 R |
| Gentamicina | 1 (S) |
| Ciprofloxacina | >1 R |
| Colistina | 1 (S) |
| CAZ/AVI | >32 R |
| MER/VBR | 0.25 S |
| IMI/REL | 0.25 S |
| Cefiderocol | 4 R |

**Caso 2 KPC-31**

# *Fast microbiology* "combinatoria" nel percorso diagnostico sepsi



# Conclusioni

- Diagnostica colturale: tutt'ora il riferimento per le infezioni batteriche, ma con numerosi limiti di cui essere consapevoli
- Nuove tecnologie in diagnostica microbiologica: rapidità, sensibilità, vantaggi per *stewardship* antibiotica e controllo infezioni
- Necessità di posizionarle correttamente nei percorsi diagnostico-terapeutici e di rivedere i modelli organizzativi (tempi di apertura, reti delocalizzate, personale adeguatamente formato)
- Interesse per studi di *outcome* (clinico, organizzativo, economico)
- Tenere presenti anche i limiti delle attuali piattaforme diagnostiche rapide: prospettiva di test genotipici *next generation* basati su genomica/ metagenomica/ trascrittomica