

Nuove frontiere analitiche in microbiologia e virologia

New analytical frontiers in microbiology and virology

Summary

The diagnosis of infectious diseases and the role of the microbiology laboratory are currently undergoing a complex and fascinating process of change. If managed correctly, this change could have a positive impact on the treatment of infectious diseases both clinically and therapeutically.

In the coming years, further evolution of molecular tests may lead to new diagnostic approaches, such as panel testing, targeting not just a single pathogen, but all possible agents suspected in a specific clinical setting. The availability of modern technology and new microfluidic devices will provide clinical microbiologists with the opportunity to be back at the bedside, proposing a large variety of mono-multiparametric molecular POC tests that will allow quicker diagnosis and improved patient care.

Camporese A. *New analytical frontiers in microbiology and virology. Trends Med 2011; 11(1):27-32.*
©2011 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

Key words:
rapid diagnosis
molecular diagnosis
point-of-care
new technologies

Introduzione

Nel processo di modernizzazione della Medicina di Laboratorio, la diagnostica infettivologica sta vivendo uno dei più fervidi momenti di trasformazione e di evoluzione, che sta mutando progressivamente il volto tecnologico dei laboratori di microbiologia e virologia, aumentando nel contempo la potenziale rappresentatività clinica del microbiologo. Contestualmente, il microbiologo clinico si trova a gestire mutamenti epocali che riguardano ormai tutta la Medicina di Laboratorio, in parte economici, organizzativi e gestionali, in parte costituiti da un nuovo modo di "pensare" e sfruttare la diagnostica, la quale richiede ormai non più solo l'imprescindibile accuratezza ed eccellenza analitica, ma una sempre maggiore efficienza ed efficacia del risultato in termini clinici¹.

Se da più parti si sostiene ormai che la sopravvivenza del labora-

torio è legata alla sua efficienza e alla sua efficacia e che nel rapporto imprescindibile medico-paziente il laboratorio deve oggi rispondere in termini non solo di prove di efficacia, ma anche di efficienza organizzativa, è su questi elementi che è necessario meditare per dare un futuro ai laboratori di microbiologia e virologia nel difficile e complesso panorama che si va delineando al termine del primo decennio del ventunesimo secolo. In altri termini, è lecito domandarsi quali siano i nuovi bisogni, quali le eventuali carenze dei servizi di microbiologia, e quali i possibili investimenti tecnologici in grado di cambiare la filosofia e l'ergonomia stessa dei laboratori per contribuire a rispondere in modo efficace ai nuovi, profondi mutamenti della medicina e al sempre maggiore coinvolgimento clinico che viene oggi richiesto al microbiologo clinico.

 **Alessandro Camporese**
SOC di Microbiologia e Virologia
Azienda S.Maria degli Angeli
Via Montereale, 24
33170 Pordenone
Tel. 0434/399247
alessandro.camporese@aopn.fvg.it

La situazione

Sensibili mutamenti di *economic environment*, quali la pressante richiesta di contrazione dei costi e il consolidamento diagnostico delle Aree Vaste, stanno incidendo oggi significativamente su tutto il panorama della Medicina di Laboratorio¹.

A questo si è aggiunto via via un radicale cambiamento delle caratteristiche della *work force* a disposizione, dovuto all'aumento dell'età media e al ridimensionato entusiasmo professionale del personale, a cui si somma lo scarso ricambio generazionale, che in molte realtà ha già significato la forzata acquisizione di *generalists* non adeguatamente formati, chiamati però a svolgere un lavoro altamente specialistico quale è la diagnostica infettivologica.

A questo certo non incoraggiante panorama sociale ed economico, fa riscontro peraltro la crescente necessità di fare anche della microbiologia e virologia un contesto dove la tecnologia riesca da un lato a sopperire alla carenza di personale, e dall'altro consenta di migliorare i tempi di risposta, con un conseguente miglioramento dell'impatto della risposta sull'*outcome*, così auspicato dal clinico, che vede nel miglioramento dei tempi di refertazione la vera chiave di volta per il miglioramento della gestione del paziente e per l'appropriatezza terapeutica, soprattutto nelle aree cliniche a maggiore criticità.

Purtroppo ancora oggi, però, se possiamo giudicare generalmente acquisito un generale, discreto livello di accuratezza e qualità analitica, non altrettanto si può dire per quanto concerne l'efficienza delle procedure diagnostiche e l'efficacia clinica del risultato: per questi aspetti, in-

fatti, c'è ancora molto da fare in diversi laboratori di microbiologia del nostro Paese, dove le procedure sono spesso tuttora ancorate a principi analitici (coltura, microscopia, sierologia) talora superati, e a principi di efficienza propri dell'epoca di Pasteur, con tempi di risposta che spesso, anziché essere decisionali per la gestione clinica e terapeutica del paziente, finiscono per configurarsi talora solo come un inutile corollario anamnestico¹⁻³.

Quando negli anni '60-'70 i clinici abbracciarono la via della così detta "terapia empirica", che tanti danni ha arrecato negli ultimi decenni in termini di scelte terapeutiche spesso criticabili, oltre ad aver contribuito in modo consistente all'aumento di consumo di farmaci e all'emergere di sempre più complessi meccanismi di resistenza, in buona parte lo fecero per mancanza di un significativo apporto della diagnosi microbiologica². Le cose, purtroppo, ad oggi non sono affatto cambiate. Ed è invece sul cambiamento di questo approccio che si basa la sopravvivenza dei laboratori di microbiologia e virologia.

E' ormai evidente, infatti, che per migliorare l'impatto clinico del risultato microbiologico, una delle esigenze gestionali emergenti consiste oggi nel produrre risultati in tempi sempre più rapidi: è, infatti, unanimemente riconosciuto che per incidere in maniera consistente nella scelta del farmaco antimicrobico riducendo la spesa e, se possibile, contestualmente il livello di mortalità è necessario riuscire a fornire un risultato in tempi il più possibile ridotti⁴.

Con queste premesse, se è vero che la qualità dei test di laboratorio oggi si misura anche in termini di *cost effectiveness*, non si può non rilevare che per garan-

tire la sopravvivenza del paziente in determinati contesti infettivologici critici, laddove la variabile "tempo" è comunque prioritaria sul costo/test, e dove per salvare il paziente si dispone per lo più solo di poche *golden hours*^{5,6}, ciò che conta è disporre di metodi e tecnologie che mettano il microbiologo nelle condizioni di rispondere in modo almeno analogo a quanto oggi riescono a fare i patologici clinici e i radiologi.

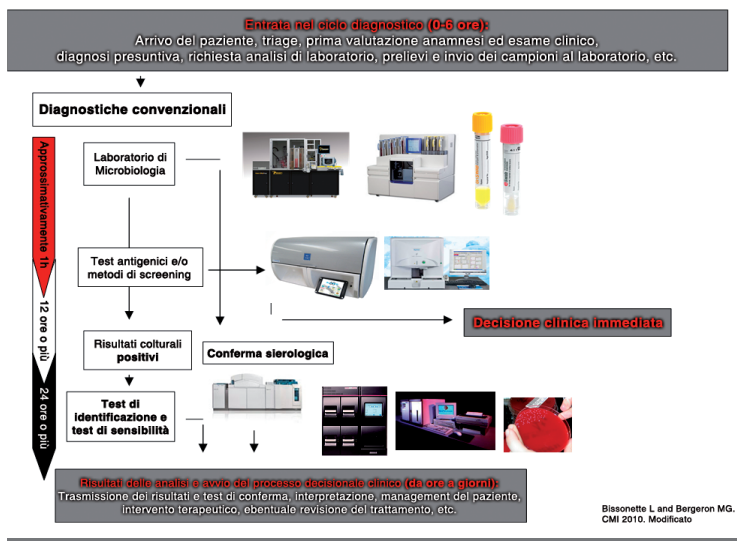
Per questo siamo oggi di fronte a una sfida nuova, gestionale oltre che strettamente analitica, un vero e proprio processo di *project management* mirato al cambiamento, che consiste principalmente nel miglioramento dei flussi di lavoro e nella scelta di test e nuove tecnologie che consentano di ottenere un livello qualitativo degli esami comunque elevato senza per questo perdere tempo prezioso per la salute del paziente, permettendo al tempo stesso di rendere maggiormente fruibile in termini clinici il risultato microbiologico⁴.

Prospettive tecnologiche

La situazione che si configura nella maggior parte dei laboratori di microbiologia e virologia del nostro Paese oggi, sia che si tratti di unità specialistiche, o di strutture che fanno capo a laboratori generali, può essere rappresentata in linea generale dai contenuti della figura 1.

Una volta superata una fase di individuazione del test più appropriato da richiedere in relazione al quadro clinico del paziente, fase che anche in regime di urgenza può richiedere talora anche qualche ora, il campione inviato al laboratorio viene ancora oggi per lo più trattato con metodi colturali e/o sierologici che

Figura 1. Percorso diagnostico tradizionale e interventi mirati al miglioramento della fase preanalitica.



richiedono tempi di risposta che superano di gran lunga le 24-48 ore. Solo in rari casi, per lo più dettati da principi ispirati dall'aumento dei campioni conseguente ai processi di consolidamento delle aree vaste, esso viene sottoposto a procedure analitiche che sfruttano l'automazione preanalitica-analitica o segue la via dei test rapidi antigenici o degli *screening* nefelometrici o citofluorimetrici, laddove disponibili, che se ben sfruttati possono peraltro contribuire in modo assolutamente efficace a individuare un precoce orientamento diagnostico in determinati contesti clinici⁷.

In realtà, diversi altri scenari tecnologici già oggi consentono, se adeguatamente sfruttati e inseriti in un contesto organizzativo adeguato, di rispondere in modo efficace ed efficiente al quesito clinico.

L'avvento della diagnostica molecolare multiparametrica e la semiautomazione/automazione dei processi di estrazione-amplificazione-rivelazione hanno, infatti, già in alcuni casi contribuito a cambiare in modo sostanziale

l'ergonomia e l'assetto analitico dei laboratori di microbiologia e virologia, consentendo di ottenere un valore aggiunto rispetto ai test colturali tradizionali^{8,9}: in questo ambito giova ricordare, ad esempio, il contributo già oggi offerto dai test molecolari per la diagnosi eziologica di sepsi, di meningite, di polmonite virale e batterica, di infezione sessualmente trasmessa o di diarrea infettiva.

La nascita e l'implementazione, poi, dei *lab-on-a-chip devices* e della microfluidica, impostisi con forza durante i primi anni del nuovo secolo a seguito del crescere dell'emergenza terrorismo (il primo test sviluppato fu, infatti, quello per la ricerca di *Bacillus anthracis*) e della necessità di disporre di strumenti maneggevoli e in grado di ottenere un risultato estremamente sensibile in tempi rapidi, ha cambiato il concetto stesso di *Point of Care Testing* (POCT), fino ad ora prevalentemente confinato alla biochimica clinica e al letto del paziente, e votato all'analisi di parametri di facile interpretazione e sfruttamento^{2,10,11}.

Strumenti analitici, quale ad esempio il *GeneXpert* di Cepheid (Sunnyvale, CA), hanno di fatto rivoluzionato il concetto stesso di test microbiologico, rendendo fruibile l'analisi molecolare *on-demand* in tempi assolutamente impensabili fino a qualche anno fa, consentendo contestualmente una gestione assolutamente semplice e intuitiva dello strumento da parte di personale tecnico anche non specificamente formato in tecniche molecolari².

Questi metodi, oggi per lo più monoparametrici, ma destinati a diventare in pochi anni multiparametrici, consentono di ottenere risultati analitici in tempi di poco superiori all'ora e con una manualità ridottissima.

Test analitici, quali ad esempio quelli dedicati alla ricerca della colonizzazione da stafilococco meticillino-resistente (MRSA) a livello nasale in pazienti ad elevata criticità, che fino a poco tempo fa richiedevano alcuni giorni di esecuzione mediante esame colturale, oggi si rendono in questo modo disponibili praticamente in tempo reale, permettendo di intervenire tempestivamente, in caso di positività, sulle procedure votate a contenere la diffusione del microorganismo ad altri pazienti. Ma soprattutto essi permettono, in base al risultato dello *screening*, di modificare l'atteggiamento chemioterapico, riducendo così il rischio di insuccesso terapeutico in caso di insorgenza di malattia da MRSA², così strettamente correlata alla colonizzazione nasale.

Lo stesso dicasi per quanto concerne la diagnosi molecolare diretta di infezione tubercolare, oggi eseguibile efficacemente con questi presidi analitici, che consentono di evidenziare nella stessa seduta, e in poco meno di

due ore, anche l'eventuale presenza di mutazione del gene *rpoB*, marker di multiresistenza¹². Recentemente, inoltre, le linee guida dell'*American Society for Microbiology* (ASM)¹³ hanno aperto la strada all'utilizzo di questi test per quanto concerne la diagnosi delle infezioni da *Clostridium difficile*, che sempre più

estesamente affliggono i nostri Ospedali e le strutture protette territoriali, al posto dei test rapidi per la ricerca delle tossine A e B, in ordine alla particolare maneggevolezza oggi raggiunta da questi sistemi analitici, che si associa a una superiore sensibilità rispetto ai test immunocromatografici.

Con l'avvento di questi strumenti, i nostri laboratori hanno così iniziato ad acquisire un nuovo assetto, caratterizzato dalla presenza di veri e propri POC molecolari¹⁴⁻¹⁷, che consentono finalmente di ottenere risultati analitici assolutamente sensibili e specifici in modo efficiente ed efficace, consentendo così al microbiologo di intervenire in tempi rapidi e in modo significativo sull'*outcome* clinico (figura 2)⁷.

Figura 2. Nuovi possibili assetti analitici e organizzativi del laboratorio di microbiologia a seguito dell'avvento di test monomultiparametrici molecolari.

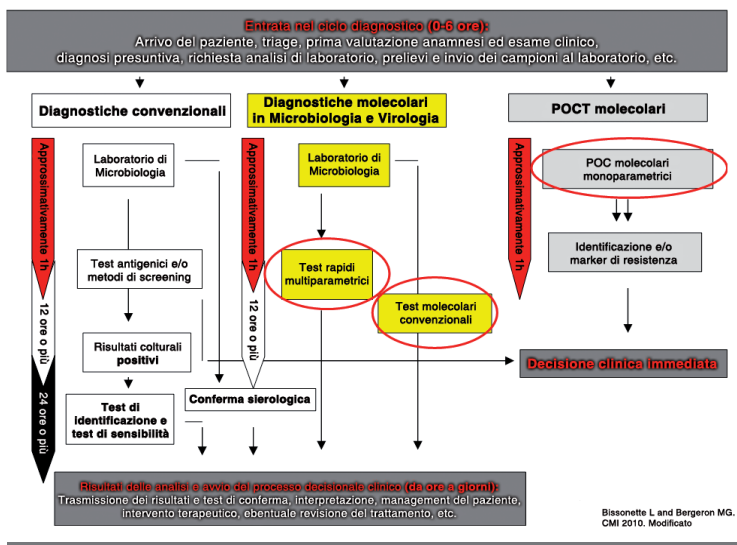
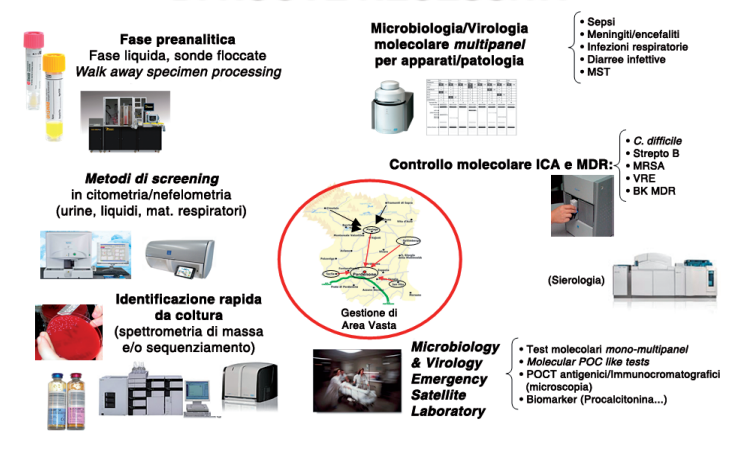


Figura 3. Sintesi delle opportunità tecnologiche disponibili oggi e nel prossimo futuro, in un contesto di Area Vasta e di crescente necessità di una maggiore efficienza ed efficacia clinica della risposta.

NUOVE TECNOLOGIE IN UN CONTESTO DI NUOVE NECESSITA'



Il futuro prossimo

L'immagine delle diverse possibili opzioni analitiche del laboratorio di microbiologia e virologia del prossimo futuro può ragionevolmente essere rappresentata dai contenuti della figura 3. Dall'immagine, com'è evidente, emerge un laboratorio che guarda al panorama attuale e del prossimo futuro in termini di opportunità e risorse tecnologiche disponibili rapportate agli attuali bisogni e agli scenari che le diminuite risorse economiche ormai prospettano, unitamente alla crescente richiesta di accorpare le diagnostiche in aree sempre più vaste.

Un laboratorio di microbiologia fortemente impegnato, *in primis*, a migliorare l'efficienza della fase preanalitica, venendo incontro così all'esigenza di consolidare quanto possibile i campionamenti delle Aree Vaste senza perdere in qualità ed efficienza del sistema. Per garantire questo obiettivo, la moderna microbiologia è ormai orientata verso l'utilizzo di sistemi di raccolta, conservazione e trasporto dei materiali ad elevata tecnologia, oggi prevalentemente rappresentati dal campionamento liquido con sonde floccate, mentre si va altresì implementando l'inserimento di *walk away specimen processing instruments*

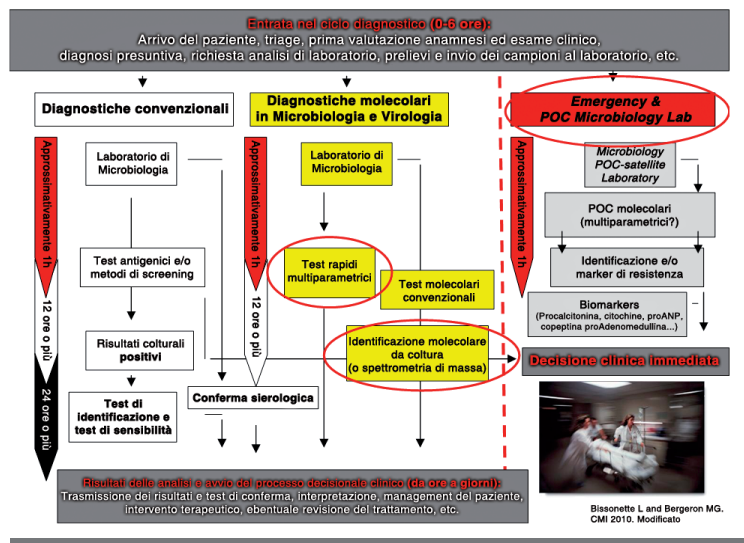
che consentono di alleggerire la fase di accettazione, di *sorting* e di semina del campione, permettendo così di *switchare* il personale tecnico verso attività maggiormente qualificanti e produttive.

Il laboratorio del prossimo futuro è però quello che guarda anche in modo determinante all'esigenza di mantenere un efficace contatto soprattutto con la realtà clinica dell'emergenza, che va di pari passo all'esigenza di abbattere quanto più possibile i tempi di risposta per dare al clinico la possibilità di intervenire tempestivamente e in modo appropriato soprattutto in contesti ad elevata criticità.

Con queste premesse, il laboratorio di microbiologia che guarda al futuro è, dunque, quello che già oggi si impegna per sviluppare, per mezzo delle tecnologie già in parte disponibili, una più efficiente ed efficace gestione della fase analitica sia diretta da campione biologico, mediante lo sfruttamento dei nuovi metodi molecolari mono e multiparametrici, sia da coltura, mediante l'utilizzo di nuove tecnologie che consentono di ottenere una diagnosi rapida dalle colonie batteriche isolate, come ad esempio la spettrometria di massa e il sequenziamento genico¹⁸⁻²².

Al tempo stesso, va invece progressivamente ridimensionandosi l'interesse per la diagnosi indiretta sierologica, che in molte situazioni cliniche appare ormai obsoleta e inefficace in quanto, a fronte della disponibilità di una diagnosi molecolare ottenibile in poche ore, non c'è ormai più spazio per una diagnosi indiretta anticorpale che, per le sue stesse caratteristiche aveva e ha una funzione per lo più anamnestica, perché in grado di fornire un risultato solo a distan-

Figura 4. Sintesi dei possibili assetti analitici e organizzativi del laboratorio di microbiologia e virologia del prossimo futuro, con la presenza di *Emergency & POC Microbiology Lab*, espressamente dedicati all'area clinica dell'emergenza.



za di diversi giorni dalla fase acuta della malattia.

Con lo sviluppo delle tecnologie che consentono di ottenere risultati in poche ore, tra i quali sono ormai disponibili, come si è visto, anche test molecolari *POC-like*, e la disponibilità di *biomarkers* in grado di indirizzare la diagnosi in situazioni cliniche ad elevata criticità, prende invece forma con forza l'idea di *Emergency & POC Microbiology Laboratories*, espressamente dedicati all'area clinica dell'emergenza².

E' evidente, dunque, che in microbiologia e virologia si stanno aprendo nuove e inedite prospettive analitiche e gestionali, a cui solo la biochimica clinica ci aveva finora abituati, che se ben sfruttate, possono mettere nelle mani dei microbiologi un concreto progetto di sviluppo e di miglioramento della qualità e dell'efficacia stessa dell'intervento diagnostico, rispetto a quanto eravamo fino ad ora abituati.

La sintesi di quello che potrebbe essere il cambiamento del-

l'organizzazione del laboratorio di microbiologia e virologia del futuro potrebbe, dunque, essere quella immaginata nella figura 4, che non è altro che l'evoluzione più naturale di quanto illustrato nelle figure 1 e 2, e che contiene i presupposti per la nascita di *Emergency Satellite Labs* espressamente dedicati all'emergenza/urgenza.

Conclusioni

Le tecnologie già oggi disponibili e quelle che stanno prepotentemente entrando a far parte della nostra quotidianità, stanno dunque radicalmente cambiando gli assetti organizzativi e gestionali dei nostri laboratori di microbiologia e virologia, mentre contestualmente si apre la strada per creare specifici poli diagnostici dedicati all'area dell'emergenza, in grado di rispondere in poche ore al quesito diagnostico nel paziente critico. Sta al microbiologo adesso sfruttare queste opportunità analitiche per fare finalmente aumen-

tare il proprio ruolo e il proprio peso nella gestione clinica del paziente.

Nonostante, infatti, stiamo vivendo un momento di grandi trasformazioni, votate prevalentemente alla riduzione della spesa e alla concentrazione spinta delle aree diagnostiche, non si può dimenticare che l'area dell'emergenza infettivologica richiede la prossimità della diagnostica al paziente e al clinico, e la disponibilità di

metodi che consentano di intervenire tempestivamente per stabilizzare la situazione clinica, possibilmente entro quelle *golden hours*, oltre le quali la vita del paziente è in pericolo.

In buona sostanza, si tratta dunque di dare un nuovo volto alla microbiologia, anche attraverso una profonda revisione degli schemi analitici tradizionali, a favore di nuove e più efficaci tecnologie, e forse è davvero giunto il momento di cominciare a

pensare seriamente a *change in culture without culture*², mentre è indifferibile un concreto ripensamento della filosofia stessa dei percorsi analitici e dei flussi di lavoro dei nostri laboratori. E' in questi "territori" del tutto inediti e finora poco sondati, che si gioca buona parte del futuro della professione del microbiologo. E' in queste prospettive di sviluppo che forse vale più la pena di investire le poche risorse oggi disponibili. **TiM**

Bibliografia

- 1. Camporese A.** Il microbiologo clinico nel panorama di modernizzazione della medicina di laboratorio. Riv Med Lab-JLM 2004; 5 (Suppl. 3):121-132.
- 2. Bissonnette L, Bergeron MG.** Diagnosing infections—current and anticipated technologies for point-of-care diagnostics and home-based testing. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1044-1053.
- 3. Millar BC, Xu J, Moore JE.** Molecular diagnostics of medically important infections. Curr Issues Mol Biol 2007; 9:21-40.
- 4. Camporese A.** The impact of automation on organizational changes in a community hospital clinical microbiology laboratory. Infez Med 2004; 2:118-125.
- 5. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al.** Duration of hypotension before initiation of antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 2006; 34:1589-1596.
- 6. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al.** Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med 2008; 36:296-327.
- 7. Clerc O, Greub G.** Routine use of point-of-care tests: usefulness and application in clinical microbiology. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1054-1061.
- 8. Avolio M, Diamante P, Zamparo S, et al.** Molecular identification of bloodstream pathogens in patients presenting to the emergency department with suspected sepsis. Shock 2010; 34:27-30.
- 9. Diamante P, Avolio M, Zamparo S, et al.** Diagnostica molecolare delle sepsi: l'esperienza di Pordenone. RIMEl / IJLaM 2010; 6:205-210.
- 10. Situma C, Hashimoto M, Soper SA.** Merging microfluidics with microarray-based bioassays. Biomol Eng 2006; 23:213-231.
- 11. Mark D, Haeberle S, Roth G, et al.** Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. Chem Soc Rev 2010; 39:1153-1182.
- 12. Helb D, Jones M, Story E, et al.** Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. J Clin Microbiol 2010; 48:229-237.
- 13. American Society for Microbiology.** A practical guidance document for *Clostridium difficile* toxin laboratory testing (August 24, 2010). <http://www.asm.org/>. Last accessed October 2010.
- 14. Rajan A, Glorikian H.** Point-of-care diagnostics: market trends and growth drivers. Expert Opin Med Diagn 2009; 3:1-4.
- 15. Trevino EA, Weissfeld AS.** The case for point-of-care testing in infectious-disease diagnosis. Clin Microbiol News 2007; 29: 177-179.
- 16. Campbell S.** My point-of-care wish list. Point Care 2008; 7:95-97.
- 17. Weile J, Knabbe C.** Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. Anal Bioanal Chem 2009; 394:731-742.
- 18. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al.** Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis 2009; 49:543-551.
- 19. Christner M, Rohde H, Wolters M, et al.** Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. J Clin Microbiol 2010; 48:1584-1591.
- 20. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, et al.** Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. PLoS ONE 2010; 5:e8862.
- 21. Sauer S, Kliem M.** Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat Rev Microbiol 2010; 8:74-82.
- 22. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, et al.** Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clin Chem 2009; 55:856-866.