

Esperienze tecnico-organizzative per gestire la diagnostica molecolare delle sepsi

A. Camporese

Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera "S.Maria degli Angeli", Pordenone

Riassunto

La somministrazione precoce di un'adeguata terapia antibiotica empirica è stata ripetutamente associata ad un aumento della sopravvivenza in corso di batteriemia. Per questo motivo, in caso di sepsi, il laboratorio di microbiologia è chiamato a fornire il risultato delle emocolture positive nel più breve tempo possibile per riuscire a guidare la terapia antibiotica. E' ormai ampiamente dimostrato, infatti, che ogni giorno perso per giungere alla diagnosi eziologica aumenta di 1-2 volte la probabilità di decesso del paziente. Questo elemento, unitamente al miglioramento dell'approccio terapeutico ottenibile in base al risultato microbiologico sottolinea il potenziale beneficio di disporre di test diagnostici rapidi in microbiologia. Negli ultimi anni sono stati descritti tutta una serie di promettenti metodi per l'identificazione microbica rapida. In quest'ottica abbiamo esplorato la possibilità di migliorare il *turnaround time* della diagnostica della sepsi utilizzando un approccio di tipo molecolare. La nostra esperienza ha dimostrato che questo approccio, se gestito e interpretato da personale esperto, anche se costoso, è assolutamente rapido ed accurato. Pur considerando che un metodo molecolare, per quanto sensibile, non può comunque sostituire ancora completamente l'emocoltura, l'esperienza maturata ci ha portato a considerare che la diagnostica molecolare, unitamente a una riorganizzazione del personale e del *workflow*, può migliorare il tempo di risposta e aumentare l'efficienza delle procedure diagnostiche, aiutando al tempo stesso lo sviluppo di nuovi algoritmi e le prospettive per la diagnosi di sepsi nel paziente critico.

Summary

Molecular diagnosis of sepsis: technical and organizational experiences

Early administration of appropriate empirical antibiotic treatment has repeatedly been associated with improved survival in patients with bacteremia. Therefore, an important task for the microbiological laboratory is to provide expedient reports on positive blood cultures that may guide antibiotic therapy in the shortest possible timeframe. It has been demonstrated that the odds of death increases 1.2-fold for each day until definitive identification is available. This and the improvement in antibiotic treatment on the basis of microbiological data underlie the potential benefit of applying rapid microbiological methods. A range of promising direct tests for rapid identification has been described in recent years. We explored the possibility of improving turnaround time of laboratory diagnosis of septicemic patients using a molecular approach. Our experience demonstrated that this approach, performed and interpreted by experienced technicians is expensive, but fast and highly accurate. Even if a sensitive molecular method cannot completely substitute for blood culture in the near future, our experience also suggests that molecular assays, as well as the reorganization of personnel, thus the workflow itself, can improve the response time and enable greater efficiency in diagnostic procedures, and may help in the development of new algorithms for the diagnosis of sepsis in critical patients.

Key words: sepsis, bacteriemia, molecular diagnosis.

La sepsi costituisce una rilevante causa di morbosità, mortalità, aumento dei costi di degenza e della spesa sanitaria, con un impegno economico annuo recentemente stimato in 7.6 miliardi di euro per l'Europa e in 17.4 miliardi di euro per gli Stati Uniti¹.

Nel mondo la sepsi colpisce circa 2 milioni di persone l'anno ed è la causa di morte di oltre 500.000 pazienti. A causa delle complicanze infettive in corso di sepsi muoiono ogni giorno nel mondo circa 1.400 persone, più di quante muoiono per cancro al colon e al seno^{1,2}.

La precocità dell'intervento terapeutico, compresa la somministrazione della terapia antimicrobica attiva sull'agente eziologico, è considerata decisiva ai fini prognostici e numerosi studi in letteratura ormai dimostrano che essa, se precoce e rapida, è associata ad una concreta riduzione della mortalità^{1,3}.

E' noto altresì che un'efficiente organizzazione del personale, in grado di garantire una continuità analitica sette giorni su sette, e l'utilizzo di metodiche e tecnologie diagnostiche adeguate consente di dimezzare i tempi di refertazione della maggior parte delle emocolture positive, influenzando così in maniera significativa sul *turnaround time* (TAT) e sulla scelta del farmaco antimicrobico, migliorando così in modo significativo l'*outcome* clinico⁴.

Nella gestione dell'emocoltura, infatti, tutt'ora considerata il *gold standard* della diagnostica delle batteriemie nonostante la sensibilità relativamente bassa^{1,5}, gli elementi critici del TAT sono essenzialmente il tempo di rilevazione della positività dei flaconi (o *time to detection*, TTD), il tempo di risposta preliminare (per via telefonica e/o informatica) e il tempo previsto per la risposta completa.

Se si esclude il tempo necessario per l'esecuzione del prelievo in reparto e il tempo richiesto per la crescita del microorganismo, tutti gli altri aspetti del *workflow*, dalla presa in carico dei flaconi in laboratorio, all'effettiva rilevazione delle positività strumentale, al tempo di risposta preliminare dell'esame microscopico diretto, fino al tempo richiesto per la refertazione finale, sono strettamente correlati agli orari di apertura del servizio⁴.

Facile evincere che un'efficiente organizzazione analitico-gestionale del laboratorio può influire in maniera consistente sui diversi *step* del flusso operativo complessivo e che il tempo necessario al raggiungimento della diagnosi microbiologica può essere riferito in buona parte al livello organizzativo raggiunto dal laboratorio.

La maggior parte dei Servizi di Microbiologia lavora peraltro ancora secondo turni del personale laureato e tecnico che non consentono di garantire una copertura per l'intera giornata e per l'intera settimana⁶: ciò crea tuttora perciò problemi non indifferenti sui tempi di risposta, in quanto gli esami colturali non possono seguire in questo modo un costante *workflow* analitico.

Nonostante questa visione ormai "storica" della gestione, di orientamento prevalentemente "biologico", basata cioè più sull'attenzione posta alla sola qualità analitica piuttosto che al tempo entro il quale produrre una risposta "clanicamente fruibile", si sta facendo strada invece l'esigenza di passare ad una gestione più concretamente "clinica", maggiormente *performante* sotto il profilo dell'efficienza e dell'efficacia⁷.

Sotto questo aspetto è doveroso sottolineare infatti che quando si parla di "qualità" in Medicina di Laboratorio, il TAT è considerato ormai un elemento di assoluta rilevanza.

Il nostro laboratorio, certificato ISO 15189:2003, ha sempre considerato prioritario l'elemento "tempo" per migliorare l'impatto clinico della risposta microbiologica.

Gli Standards ISO 15189:2003⁸, infatti, al punto 5.8.11 definiscono che "il TAT deve riflettere le necessità cliniche", mentre Joint Commission International⁹ allo Standard AOP.5.3 sottolinea che "Results are reported within a time frame

based on patient needs, services offered and clinical staff needs". Il College of American Pathologists (CPA) va addirittura oltre in un recente *Q-Track Monitor*¹⁰, definendo che "The turnaround time that exceed the expectations of clinicians who order the tests, the so-called outlier test reporting rates may be responsible for perceptions of inadequate laboratory service". Secondo il CPA, andrebbe dunque considerato "inadeguato" il laboratorio che, pur garantendo la qualità analitica, ha un TAT che eccede il valore clinico atteso.

Un concetto che, a leggere i dati di recenti autorevoli indagini⁶, sembra peraltro del tutto nuovo per non dire sconosciuto a molti Laboratori di Microbiologia italiani.

Nella diagnostica della sepsi la "variabile tempo" è, come noto³, un valore effettivamente di assoluta rilevanza in termini di *outcome* clinico. E' ormai ampiamente dimostrato, infatti, che ogni giorno perso per giungere alla diagnosi eziologica di una batteriemia e per ottenere una valutazione della sensibilità dell'isolato agli antimicrobici aumenta di 1-2 volte la probabilità di decesso del paziente, mentre in caso di sepsi grave l'*outcome* clinico e la probabilità di sopravvivenza del paziente, se rapportata ai parametri diagnostico-prognostici, è esprimibile addirittura in termini di ore, come ormai dimostrato da recenti autorevoli studi³.

Nella nostra realtà abbiamo recentemente sperimentato con successo⁴ l'impatto sul TAT dell'utilizzo diretto da flacone dei test tradizionali in un contesto organizzativo già di assoluta efficienza se confrontato con la realtà italiana⁶ rappresentato da un'operatività analitica di eccellenza garantita sette giorni su sette che ha consentito nel 2007 di ottenere più dell'80% dei referti delle emocolture entro 48 ore e più del 95% entro 72 ore.

Con queste premesse, e considerata la nostra già consistente e consolidata esperienza di biologia molecolare in virologia e in alcune diagnostiche batteriologiche, abbiamo ritenuto che poteva essere ragionevole pensare di implementare questo metodo analitico con l'obiettivo di fornire un indirizzo eziologico più efficiente ed efficace in caso di sepsi grave.

Premesso che oggi un test molecolare mirato alla diagnostica delle sepsi non può che utilizzare necessariamente una *Real-time* PCR di tipo *multiplex*, dato l'ampio *range* di potenziali agenti eziologici, e che deve essere in grado di identificare *target* ottimali che garantiscano livelli altrettanto ottimali di sensibilità e specificità, si è scelto di sperimentare il sistema *SeptiFast*® (Roche Diagnostics, Milano, Italia), che applica la tecnologia *Real-time* PCR alla diagnosi molecolare di sepsi.

La scelta è nata dall'esigenza di mettere a disposizione del nostro laboratorio un metodo che in situazioni di criticità consentisse di ottenere una maggiore sensibilità rispetto all'emocoltura, contestualmente alla capacità di rilevare in un'unica seduta analitica parallela diversi batteri Gram negativi, Gram positivi e miceti, per un totale di 25 microrganismi potenziali responsabili di sepsi. *SeptiFast*® utilizza come *target* per l'identificazione la regione così detta "internal transcribed spacer" (ITS), posta tra le sequenze 16S e 23S del DNA ribosomiale dei batteri Gram positivi e Gram negativi e tra le sequenze 18S e 5.8S del DNA ribosomiale dei miceti. La regione ITS è molto stabile, altamente specie-specifica e in grado di fornire una maggiore sensibilità analitica rispetto a una singola copia di geni in quanto pre-

sente in svariati operoni nei genomi di batteri e miceti.

In breve il test consta di tre successive fasi analitiche: estrazione mediante lisi meccanica e purificazione del DNA; amplificazione in real-time PCR del DNA purificato in tre reazioni parallele (batteri Gram positivi, batteri Gram negativi e miceti) e contemporanea rivelazione con sonde di ibridazione specifiche; identificazione, al termine dell'amplificazione, attraverso un'analisi delle curve di melting specifiche che permette di differenziare le specie rilevate: la temperatura di melting (T_m) di ciascuna sequenza *target* è infatti fortemente caratteristica e dipende dalla lunghezza, dalla sequenza e dal grado di omologia tra la sonda utilizzata e il DNA *target*. Le T_m dei campioni e dei controlli sono poi analizzate da un software di identificazione dedicato (SIS: *SeptiFast® Identification Software*). Al termine del processo di analisi del SIS viene generato un *report* relativo ai risultati dei controlli, alle informazioni sulla validazione della seduta e a tutte le specie microbiche rilevate nei campioni biologici.

L'utilizzo sperimentale di *SeptiFast®* ci ha subito posti di fronte a una serie di valutazioni, esigenze e criticità tecnico-organizzative che devono essere affrontate e risolte da chiunque intenda implementare l'utilizzo del metodo.

Da un punto di vista tecnico-logistico, il primo problema è consistito nell'eliminazione di qualsiasi elemento che potesse contaminare la procedura analitica. Quando si lavora con una tecnica di biologia molecolare in grado di amplificare, come in questo caso, un ampio spettro di batteri e miceti è necessario, infatti, intervenire drasticamente sull'intero processo affinché siano eliminate tutte le variabili che possono influire negativamente sull'aspetto della potenziale contaminazione dell'analisi.

Il flusso di lavoro deve perciò essere garantito e realizzato in locali dedicati e assolutamente *DNA-free*, utilizzando materiali idonei e una particolare attenzione alla manipolazione dei campioni soprattutto nelle fasi di estrazione, purificazione e preparazione delle *mix*, tutti processi che devono comunque essere eseguiti rigorosamente sotto cappa a flusso laminare.

Il personale tecnico, qualunque sia l'esperienza già maturata in biologia molecolare, deve comunque essere reso consapevole in merito ai comportamenti che consentono di evitare qualunque possibilità di contaminare la procedura garantendo così la qualità analitica e l'efficacia diagnostica.

Il personale addetto alla cura e alla pulizia dei locali deve a sua volta essere istruito per intervenire correttamente senza contaminare l'ambiente di lavoro e per procedere dopo ogni seduta alla completa ed efficace decontaminazione delle superfici.

La fase logistico-strutturale, rappresentata dalla disponibilità di spazi e strumenti dedicati, e la fase formativa del personale, che deve consentire di ottenere un *team* di operatori sufficiente per consentire la continuità analitica durante tutta la settimana, rappresentano forse gli elementi maggiormente critici per garantire l'implementazione del metodo.

SeptiFast® infatti è, come l'emocoltura, un test urgente e ha un rationale solamente se ne viene garantita l'esecuzione per tutto l'arco della settimana, festivi compresi. Ciò comporta da un punto di vista tecnico-organizzativo un note-

vole investimento in termini di disponibilità di risorse umane ed economiche che non può essere sottovalutato, ma che può essere recepito dalle Amministrazioni se inquadrato nell'ottica del miglioramento continuo della qualità totale dell'assistenza e dell'*outcome* clinico per rispondere concretamente ai "bisogni del paziente e dello staff clinico", così come puntualmente espresso nello Standard AOP.5.3 di Joint Commission International⁹, al cui percorso di accreditamento la nostra Azienda Ospedaliera ha deciso recentemente di sottoporsi.

Da un punto di vista strettamente operativo, inoltre, se è vero che tutta la procedura è eseguibile in circa sei ore, è vero altresì che essa, soprattutto nella fase di estrazione e purificazione è particolarmente *labor intensive*, e prevede un impegno tecnico di almeno 3 ore effettive per seduta.

Nel contesto organizzativo generale l'inserimento della diagnostica molecolare delle sepsi influisce dunque in maniera significativa sulla gestione del personale e sui turni di lavoro.

Per chiarire meglio quale può essere l'impatto di questo nuovo metodo sull'organizzazione di un Laboratorio di Microbiologia che già svolge un'attività estesa su sette giorni e quali possano essere i risultati attesi, può essere utile l'esempio applicato alla nostra realtà.

Il nostro laboratorio svolge attività diurna (mattino e pomeriggio) dal lunedì al venerdì con organico pieno, mentre il sabato e la domenica l'attività è garantita con personale ridotto.

Una volta garantita la continuità analitica con la presenza di almeno un tecnico abilitato alla diagnostica specifica nei diversi turni di servizio, il campione per *SeptiFast®*, prelevato contestualmente ai flaconi di emocoltura, può seguire un *workflow* che può essere così riassunto: il campione che arriva in laboratorio al mattino può essere processato e refertato entro il pomeriggio dello stesso giorno. Il campione che giunge nel primo pomeriggio può essere processato completamente o almeno per la fase di estrazione e purificazione del DNA, mentre la refertazione può essere eseguita alla riapertura del laboratorio il mattino seguente. I campioni giunti nel tardo pomeriggio, durante la notte o nel pomeriggio dei giorni festivi e prefestivi possono essere conservati in frigorifero e processati il mattino seguente.

Con questi presupposti, è possibile quantificare il potenziale risparmio in termini di tempo che si può ottenere con *SeptiFast®* rispetto alla diagnostica tradizionale, purchè comunque utilizzata direttamente da flacone⁴ piuttosto che secondo le normali procedure, partendo dal presupposto che il confronto non può che essere realizzato tra il metodo molecolare e i test di identificazione biochimici, in quanto *SeptiFast®* consente effettivamente di ottenere solo un'identificazione di specie microbica e non un test di sensibilità.

Nella Tabella I è riassunto il potenziale impatto di *SeptiFast®* in termini di risparmio sul TAT rispetto all'utilizzo di test diretti da emocoltura nel caso di un campione che giunga in laboratorio al mattino o nel pomeriggio/sera, prendendo ad esempio tre diversi contesti clinici: una batteriemia da enterobatteri, una sepsi da *Staphylococcus aureus* e un'infezione fungina sistemica.

Nel caso, ad esempio, di una batteriemia da enterobatte-

Tabella I. Impatto di *SeptiFast*® in termini di risparmio sul TAT rispetto all'utilizzo di test diretti da emocoltura.

	TAT medio di identificazione diretta da emocoltura arrivata al mattino	TAT medio di <i>SeptiFast</i> ® arrivato al mattino	TAT medio di identificazione diretta da emocoltura arrivata al pomeriggio/sera	TAT medio di <i>SeptiFast</i> ® arrivato al pomeriggio/sera
Infezione sistemica da enterobatteri	34 ore dall'arrivo in laboratorio	7 ore dall'arrivo in laboratorio (-27 ore)	48 ore dall'arrivo in laboratorio	20 ore dall'arrivo in laboratorio(-28 ore)
Infezione sistemica da <i>S.aureus</i>	36 ore dall'arrivo in laboratorio	7 ore dall'arrivo in laboratorio (-29 ore)	50 ore dall'arrivo in laboratorio	20 ore dall'arrivo in laboratorio(-30 ore)
Infezione fungina sistemica	72 ore dall'arrivo in laboratorio	7 ore dall'arrivo in laboratorio (-65 ore)	85 ore dall'arrivo in laboratorio	20 ore dall'arrivo in laboratorio(-65 ore)

ri, nel nostro laboratorio più del 90% dei flaconi di emocoltura si positivizza entro le 24 ore⁴.

Il TAT medio per fornire un'identificazione, in caso di infezione monomicrobica, utilizzando i metodi diretti da flacone è di circa 40 ore dal momento dell'arrivo del campione in laboratorio.

Se infatti, ad esempio, i flaconi giungono al mattino, la refertazione può avvenire di consueto dopo 34 ore, cioè entro il pomeriggio del giorno seguente. Se i flaconi giungono nel tardo pomeriggio/sera la refertazione di solito può avvenire il mattino di due giorni dopo (dopo circa 48 ore dall'arrivo in laboratorio).

Utilizzando *SeptiFast*®, nel primo caso il referto può essere potenzialmente disponibile già circa 6-7 ore dopo l'arrivo in laboratorio, con un risparmio sul TAT di circa 27 ore, mentre nel secondo caso il referto può essere fruibile, a seconda dell'orario di effettivo arrivo del campione, circa 20 ore dopo, sempre comunque con un risparmio sul TAT di circa 28 ore.

Il risparmio stimabile sul TAT nel caso di una sepsi da *Staphylococcus aureus* è pressoché sovrapponibile, con in più il vantaggio di poter confermare o escludere in una successiva seduta con lo stesso metodo anche l'eventuale meticillino-resistenza.

L'impatto, come si evince dalla Tabella I, è ancora maggiore nel caso di un'infezione fungina sistemica, temibile evenienza soprattutto in pazienti immunocompromessi.

In questo caso, infatti, la riduzione del TAT è comunque di circa 65 ore rispetto al test di identificazione presuntiva eseguito direttamente da flacone di emocoltura.

Qualora si confrontino le *performance* di *SeptiFast*® con il tempo necessario per ottenere un'identificazione mediante le normali procedure standard anziché utilizzando i test diretti da flacone di emocoltura, il risparmio sul TAT sale a circa 50 ore nel caso di infezione da enterobatteri e *Staphylococcus aureus* e addirittura a circa 110 ore nel caso di infezione fungina.

Nonostante questi potenziali risultati, da un punto di vista gestionale *SeptiFast*® non è comunque certamente un test che può trovare allo stato attuale una collocazione nella piena *routine* diagnostica, in quanto richiede notevole esperienza tecnica e strutture adeguate e perché allo stato attuale richiede ancora una non trascurabile manualità.

Considerando che nel 2007 nella nostra realtà sono stati esaminati 6.248 pazienti per sospetta sepsi, è certamente improponibile pensare di utilizzare il metodo anche solo

nella metà di essi, sia da un punto di vista tecnico-organizzativo, sia da un punto di vista strettamente economico, in tempi di diffuso contenimento dei *budget*.

Se è vero, peraltro, che i costi per seduta analitica sono piuttosto elevati, ciò che dovrebbe far meditare è che la spesa non è comunque superiore anche solo a una giornata di terapia con antibiotici tra i più utilizzati per il trattamento delle sepsi da Gram positivi e Gram negativi, quali ad esempio i glicopetpidi o i carbapenemici, per non parlare dei più recenti antifungini.

SeptiFast®, comunque, allo stato attuale non può che essere considerato un test di nicchia che ha l'obiettivo di fornire una risposta più efficiente ed efficace dell'emocoltura per quanto concerne l'identificazione microbica in caso di sospetta sepsi grave in contesti critici, con particolare riguardo, ad esempio, all'area dell'emergenza.

Da un punto di vista microbiologico e clinico, infine, la maggiore esigenza in prospettiva è quella di ottenere un ulteriore ampliamento del già esteso spettro microbico rilevabile, soprattutto per quanto riguarda i Gram negativi. Ciò consentirebbe l'applicazione del test anche a campioni diversi dal sangue, quali ad esempio i liquidi da cavità chiuse, e soprattutto permetterebbe il suo utilizzo anche per la diagnosi rapida di meningite batterica. Contestualmente si dovrà lavorare sull'implementazione dell'automazione del metodo e sulla possibilità di rilevare altri *target* di resistenza critici oltre alla meticillino-resistenza.

Siamo comunque di fronte a una rivoluzione non solo in termini analitici, ma anche sotto il profilo tecnico-organizzativo, che se correttamente gestita è destinata a modificare profondamente nel prossimo futuro non solo il volto della diagnostica microbiologica delle batteriemie, ma la filosofia stessa e l'organizzazione del *workflow* in Microbiologia, contribuendo in modo concreto al miglioramento dell'*outcome* clinico.

Bibliografia

1. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008; 36:296-327.
2. Imahara SD, Nathens AB. Antimicrobial strategies in surgical critical care. *Current Opinion Crit Care* 2003; 9:286-91.
3. Bouza E, Sousa D, Munoz P, Rodriguez-Creixems M, Fron C, Lechuz JG. Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting blood culture results. *Clin Infect*

- Dis 2004; 39:1161-9.
4. Grosso S, Camporese A. Valutazione di appropriatezza, efficienza ed efficacia di alcune procedure analitiche per ridurre il turnaround time delle emocolture. RIMeL / IJLaM 2007; 3:203-12.
 5. Rice TW, Wheeler AP. Severe sepsis. *Infect Med* 2003; 20: 184-93.
 6. Goglio A, Nicoletti P. Indagine nazionale sulle metodiche per emocoltura in Italia. *Microbiologia Medica* 2004; 19:1-13.
 7. Camporese A, Li Bergoli M. Il cambiamento del microbiologo: dalla visione "biologica" alla visione "clinica". *Riv Med Lab JLM* 2002; 3:116-20.
 8. ISO 15189:2003 Medical laboratories, Particular requirements for quality and competence. <http://www.iso.org> (ultima consultazione 25/07/2008).
 9. Joint Commission International Accreditation Standards for Hospitals, Third Edition, Effective January 2008. <http://www.jointcommissioninternational.org> (data di consultazione: 25.07.2008).
 10. Novis DA, Walsh MK, Dale JC, Howanitz PJ. Continuous monitoring of stat and routine outlier turnaround times. *Arch Pathol Lab Med*, 2004; 128:621-6.