Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche

UNIVERSITÀ DI PAVIA

Riorganizzazione del SSR del Veneto e Tecnologia MALDI-ToF MS nella diagnostica delle emocolture

Dott.ssa Paola Calvi

Anno Accademico 2016/2017

IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE VENETO

LEGGE REGIONALE
N. 19/2016

L'eccellenza della qualità dei servizi erogati ai pazienti costituisce la finalità principale dei sistemi sanitari nazionali ed è stata assunta come la funzione centrale del sistema di Clinical Governance (CG).

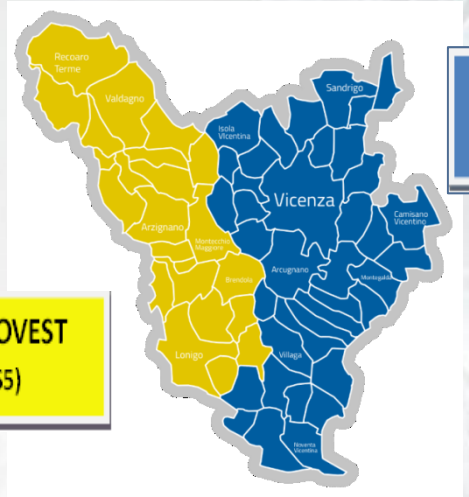
CLINICAL GOVENARNANCE

"Sistema di progettazione, gestione e controllo efficiente, efficace, etico dell'ambiente sanitario"

AULSS 8 BERICA

REGIONE DEL VENETO
ULSS8 BERICA

L'Azienda ALSS n.8 Berica costituita dal 1° gennaio 2018



DITRETTO EST
(Ex ULSS6)

DITRETTO OVEST
(Ex ULSS5)

492.422 abitanti
61 comuni

6 ospedali
1362 posti letto

LABORATORI DI MICROBIOLOGIA
Distretto EST (EX ULSS 6)

Unità operativa complessa con 7 dirigenti medici, 18 tecnici di laboratorio, sette operatori e due infermiere. Il personale è in servizio dal lunedì al sabato, mentre è in reperibilità notturna e festiva.

SEZIONE DI MICROBIOLOGIA di ARZIGNANO
Distretto OVEST (EX ULSS 5)

1 dirigente medico, condiviso per guardie e turni con la Patologia Clinica e due tecnici di laboratorio part-time. Chiusura venerdì alle 15.

22 Comuni

182.000 abitanti

SIGNIFICATO CLINICO DELL'INDAGINE EMOCOLTURALE

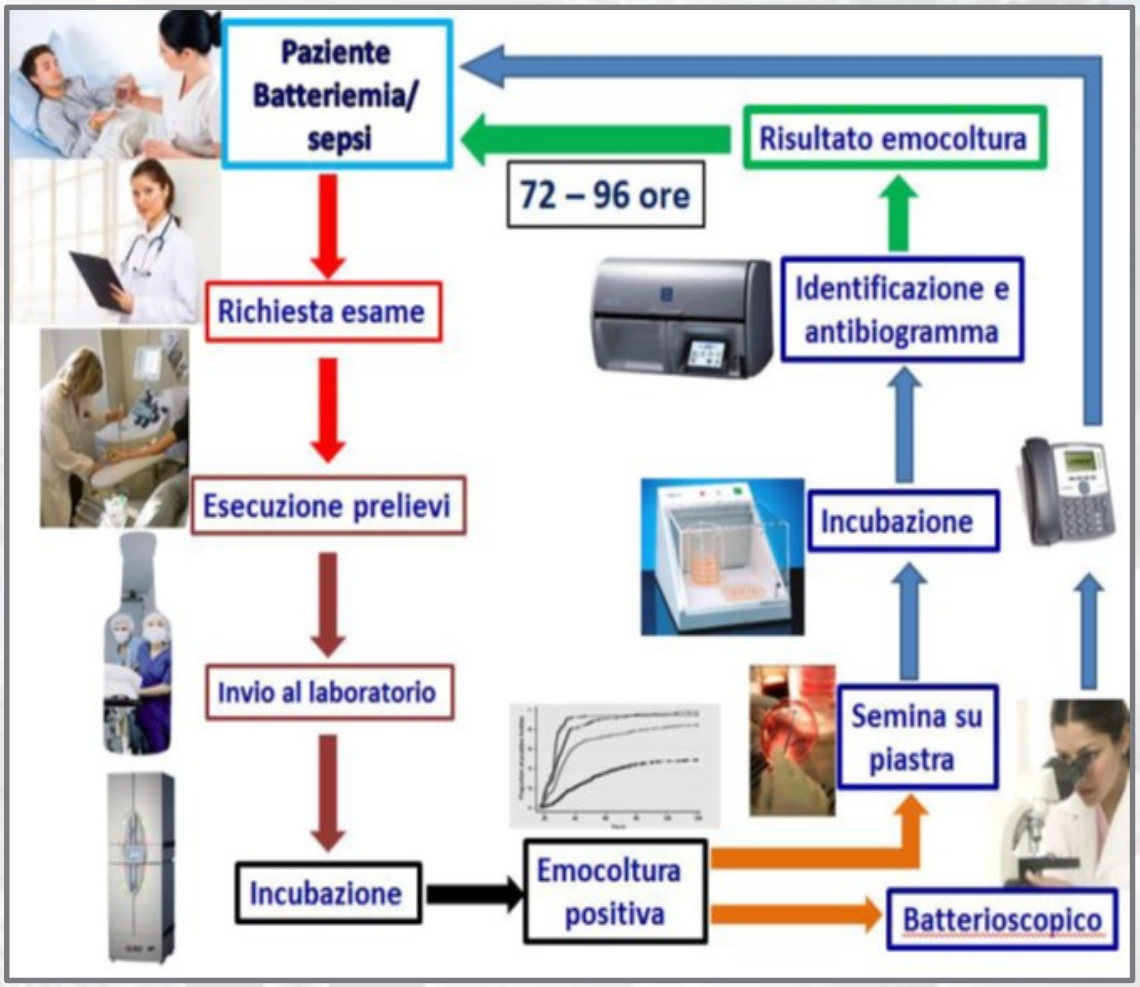
L'emocoltura rappresenta il "gold standard" per la diagnosi di infezioni del torrente circolatorio.

Permette di stabilire l'eziologia infettiva della risposta infiammatoria sistemica.

Rende possibile valutare la sensibilità del microrganismo isolato agli antibiotici, fornisce al clinico informazioni fondamentali per una terapia mirata

Rappresenta un importante contributo del microbiologo nella gestione del fenomeno sepsi

tradizionale flusso pre-analitico – analitico – post-analitico di un'emocoltura



Nella diagnostica della sepsi la **"variabile tempo"** è un valore di assoluta rilevanza in termini di **outcome clinico**

Tecniche innovative, rapide ed altamente specifiche che consentono una notevole riduzione dei tempi di refertazione

Queste tecniche si differenziano in due fondamentali categorie:

- Nucleic acid-based techniques
- Not nucleic acid -based techniques

In riferimento alla metodica impiegata, i Test NATs si dividono in:

- Amplified (PCR-based):
- Not amplified (hybridization-based):

PCR and Microarray-based (BMC Microbiology)

Il test PNA-FISH si basa sull'utilizzo di sonde fluorescenti di Peptidi di Acido Nucleico (PNA)

Not nucleic acid - based techniques

Capillare presenza nei laboratori di Microbiologia

SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI –ToF MS
MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION TIME-OF- FLIGHT

SPETTROMETRIA DI MASSA

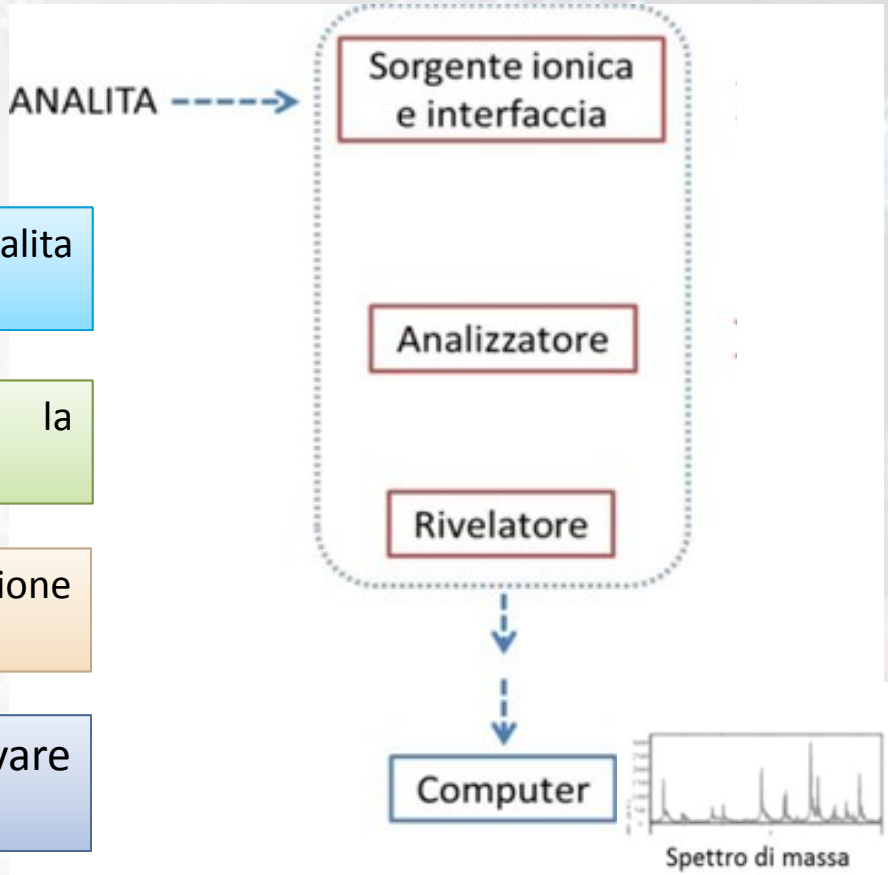
Uno spettrometro di massa consiste di quattro componenti principali:

la sorgente, dove avviene la ionizzazione dell'analita e il passaggio allo stato gassoso;

l'interfaccia che assicura il trasporto e la focalizzazione degli ioni verso l'analizzatore;

l'analizzatore, dove gli ioni sono separati in funzione del loro rapporto massa su carica (m/z);

il rivelatore (detector), che permette di rilevare e registrare gli ioni.



Il principio su cui si basa è la separazione di una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z) generalmente tramite campi elettrici o magnetici.
La presenza della carica, positiva o negativa, è un presupposto essenziale per poter analizzare le molecole; in assenza di carica non sarebbero soggette all'azione di campi elettrici o magnetici presenti negli analizzatori.

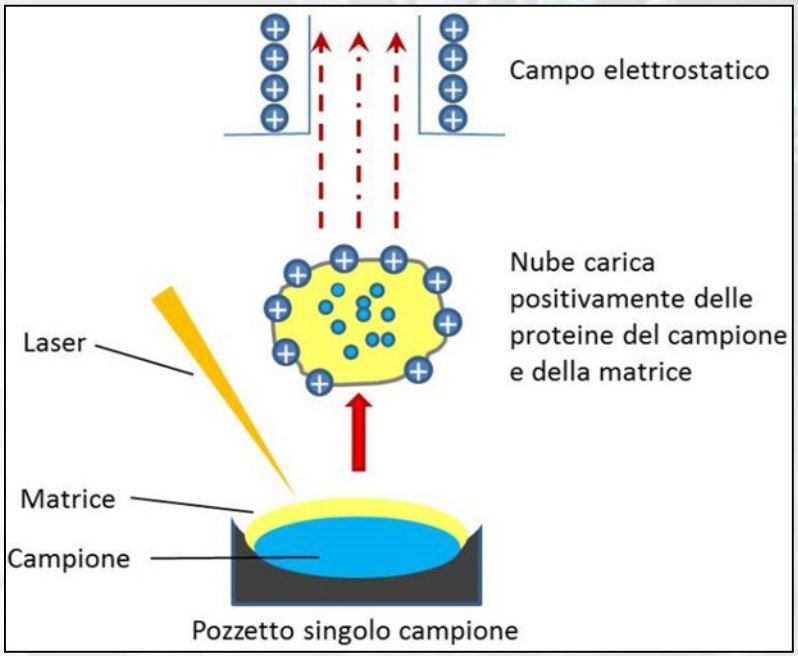
MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION TIME-o F- FLIGHT (MALDI –ToF MS)

Tutti i principi dei moderni analizzatori di massa erano ben noti sin dagli anni quaranta

Le tecniche di ionizzazione che venivano utilizzate richiedevano un campione da analizzare relativamente volatile ed inducevano un'estensiva decomposizione dell'analita.

Sviluppo a metà degli anni'80 dei metodi di ionizzazione "soft", combinarono la tecnologia laser con l'utilizzo di una matrice per assistere il desorbimento/ionizzazione degli analiti..

Le matrici utilizzate per la tecnologia MALDI sono acidi di basso PM che co-cristalizzano il campione evitando l'aggregazione di molecole dell'analita.

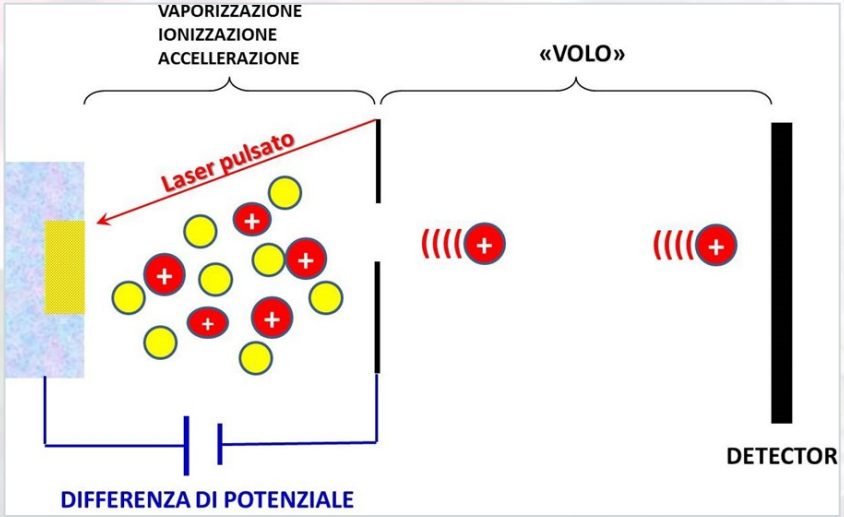


Ne impediscono la distruzione assorbendo la potenza del laser e trasferendo al campione l'energia necessaria al desorbimento garantendone il passaggio allo stato gassoso senza danneggiarlo.

Il desorbimento diventa così indipendente dalle proprietà intrinseche dell'analita.

L'ANALIZZATORE A TEMPO DI VOLO (ToF)

La sorgente MALDI è associata ad un analizzatore a tempo di volo: il concetto di separazione degli ioni secondo il loro rapporto massa/carica in funzione del loro tempo di volo risale al 1946 , ma l'elettronica di acquisizione e rivelazione non erano sufficientemente sviluppate per renderlo utilizzabile.



A seguito dell'irradiazione con luce laser avvengono essenzialmente due processi, il desorbimento del cristallo e la ionizzazione dell'analita.

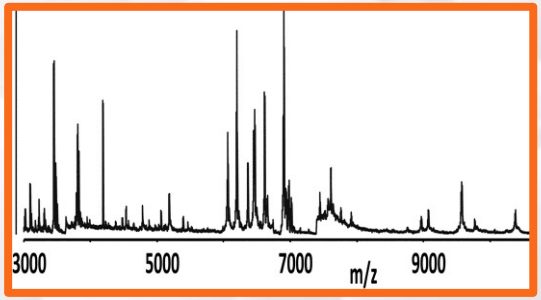
Gli ioni prodotti sono espulsi a pacchetti che vengono accelerati da una differenza di potenziale decrescente (da 20 a 15kV) che conferisce la stessa energia cinetica agli ioni formati.

Tali ioni vengono trasferiti nel tubo di volo nel quale viene generato un alto vuoto (10^{-7} mbar) dove si separano in base alla loro massa ed il tempo impiegato per arrivare al detector è proporzionale alla radice quadrata del loro rapporto massa/carica (m/z).

Maggiore sarà la massa della proteina, più lentamente raggiungerà il detector. Il tempo di volo è quindi inversamente proporzionale alla massa.

La risoluzione (R) di un analizzatore definisce la sua capacità di separare ioni con rapporto m/z simile . Per un ToF senza particolari accorgimenti la risoluzione è dell'ordine di 1000 parti per milione (ppm). L'utilizzo di un tubo di volo più lungo, o di un "reflector" elettrostatico all'estremità del tubo migliorarano la precisione della misura.

Il segnale che viene generato è direttamente proporzionale al numero di ioni che raggiungono il detector ed è trasformato dal rilevatore in uno spettro di massa che costituisce una sorta di impronta digitale del campione analizzato.



MALDI-ToF IN MICROBIOLOGIA CLINICA

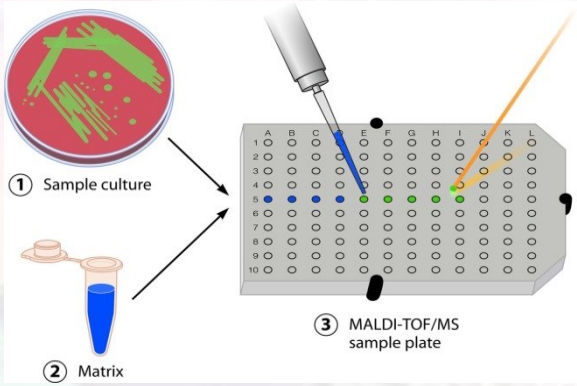
Negli ultimi anni la spettrometria di massa mediante tecnologia MALDI-ToF è diventata un potente strumento per la diagnosi di laboratorio in microbiologia.

Caricamento su piastra MALDI

Depositare il campione direttamente su piastra MALDI

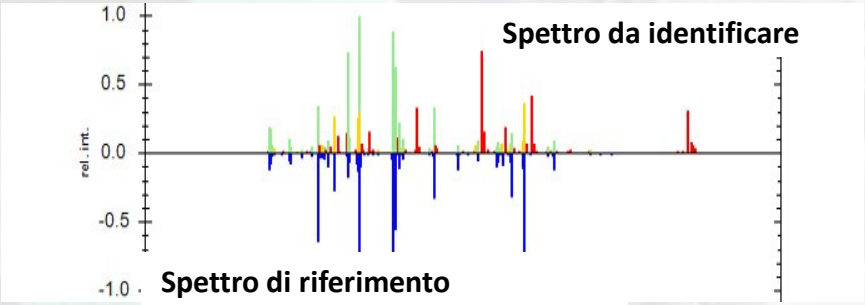
Aggiungere 1µl di Acido Formico (70%)

Aggiungere 1µl di Matrice



L'identificazione dei diversi microrganismi avviene sfruttando le molteplici differenze riscontrate tra le varie specie a livello delle proteine ribosomiali e la loro alta conservazione in ceppi appartenenti alla stessa specie.

Le proteine ribosomiali sono facilmente ionizzabili e minimamente influenzate dalle condizioni di crescita microbica, per questa ragione rappresentano il pattern proteico ideale per la formazione di uno spettro specie-specifico.



L'identificazione del microrganismo in esame avviene mediante un programma dedicato collegato allo strumento che confronta ciascun spettro ottenuto con quelli di riferimento presenti all'interno di una banca dati attraverso un approccio statistico di analisi multivariata che include posizione ed intensità del picco.

Il programma calcola un punteggio identificativo arbitrario, il cosiddetto "Valore di Confidenza" o "Score" che riflette il grado di corrispondenza con lo spettro di riferimento di ogni microrganismo presente ed esprime il grado di certezza con cui viene proposta l'identificazione per il microrganismo in esame

TAT EMOCOLTURE POSITIVE DISTRETTO EST/DISTRETTO OVEST

L'esigenza di accelerare quanto più possibile la risposta delle emocolture è uno degli obiettivi prioritari in microbiologia, per poter incidere in maniera clinicamente utile nella scelta del farmaco antimicrobico, riducendo possibilmente il livello di mortalità nei pazienti con infezione sistemica.

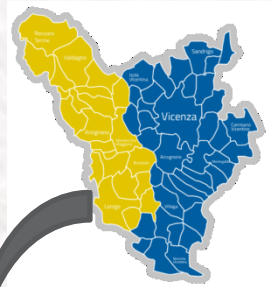
Esistono dati solidi in letteratura che dimostrano come l' introduzione della identificazione rapida con MALDI-TOF da emocoltura porti significativi benefici in termini di outcome clinico nei pazienti con sepsi (Huang *et al.*, 2013).

OSPEDALE SPOKE (DISTRETTO OVEST)

- allestimento del vetrino per l'esame microscopico
- semina del brodo di emocoltura positivo su terreni agarizzati, incubazione 24-48 ore
- i saggi di identificazione e di suscettibilità antibiotica vengono routinariamente eseguiti con sistemi automatizzati. Il TAT per identificazione di specie e antibiogramma è di 72-96 ore

L'identificazione eziologica di sepsi in seguito ad emocoltura positiva in 72-96 ore, ad esclusione della comunicazione dell'esame microscopico, può rientrare oramai a buon diritto nell'ambito della storia della Microbiologia.

REGIONE DEL VENETO ULSS8 BERICA



OSPEDALE HUB (DISTRETTO EST)

- allestimento del vetrino per l'esame microscopico
- semina del brodo di emocoltura positivo su terreni agarizzati, a cui segue una fase d'incubazione ridotta (in genere 6 ore)
- identificazione tramite MALDI-TOF
- antibiogramma eseguito in microdiluizione, inoculando i pannelli con MIC estesa

Questo permette di fornire l'identificazione circa 6-8 ore dopo la positivizzazione dell'emocoltura, a basso costo e con un impatto minimo sulla organizzazione del laboratorio .

Il superamento di questa situazione è avvenuto con la nascita dell'AULSS 8 e la conseguente confluenza del laboratorio di Microbiologia dell'ex ULSS5 nel Laboratorio dell'Ospedale di Vicenza.

CONCLUSIONI 1

L'unificazione delle ULSS venete nelle 9 attuali in seguito alla riforma del Servizio Sanitario Regionale, ha reso possibile e disponibile la tecnologia e le innovazione del Laboratorio Hub di Microbiologia dell'ospedale di Vicenza ai campioni microbiologici provenienti dal laboratorio Spoke dell'ospedale di Arzignano, a cui affluisce un bacino di utenza di circa 180.00 abitanti.

Le criticità maggiori finora identificate sono rappresentate dalla tempistica dei trasporti, in modo particolare per quanto riguarda l'orario di partenza dal laboratorio periferico verso il laboratorio centrale e dal loro numero.

Di particolare importanza diverrà nei prossimi mesi predisporre degli indicatori che permettano una reale valutazione dei risultati ottenuti, in particolare per quanto riguarda la diagnostica eziologica di sepsi, la valutazione del TAT complessivo delle emocolture positive, dalla rilevazione della positività alla comunicazione al clinico e all'effettivo utilizzo delle informazioni.

Necessità di identificare modalità, tempistiche e turnazioni del personale che possano assicurare ai pazienti della "periferia", medesime opportunità diagnostiche e terapeutiche dei pazienti ricoverati nelle strutture ospedaliere ove sono localizzati i laboratori adeguatamente e modernamente attrezzati.

"Il microbiologo clinico si trova a gestire in questi anni grandi cambiamenti, in parte economici, organizzativi e gestionali, in parte costituiti da un nuovo modo di pensare e sfruttare la diagnostica, la quale richiede non più solo l'imprescindibile accuratezza ed eccellenza analitica, ma una sempre maggiore efficienza ed efficacia del risultato in termini clinici" (Camporese A. 2011)

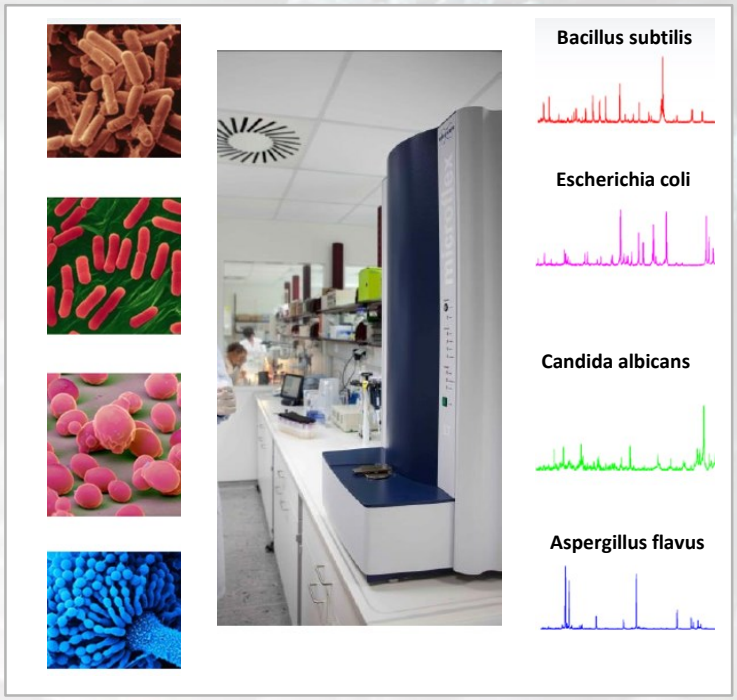
CONCLUSIONI 2

La variabile tempo diventa essenziale nelle diagnosi d'urgenza in quella che, per frequenza, è l'urgenza per definizione: la Sepsi.

La nuova Microbiologia clinica è decisamente orientata ad abbinare all'efficacia dei propri risultati una efficienza organizzativa che li renda terapeuticamente utili.

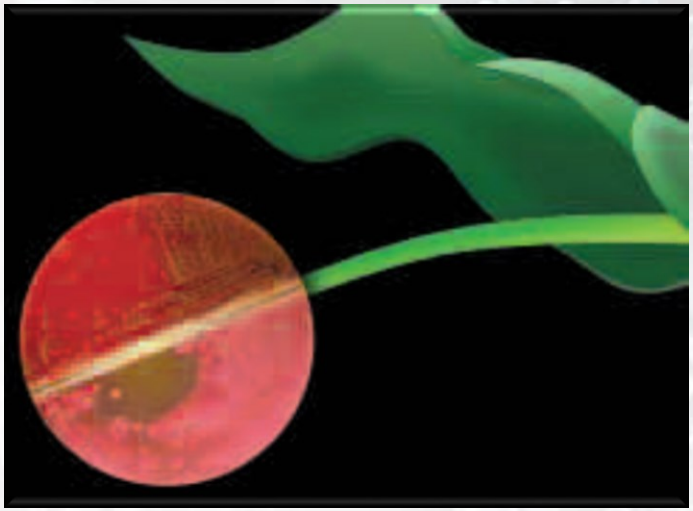
In questo contesto la spettrometria di massa MALDI-ToF rappresenta una alternativa estremamente valida ai convenzionali sistemi di identificazione, sia biochimici che molecolari.

E' un metodo rapido che necessita di una minima preparazione del campione e utilizza reagenti a basso costo, consentendo risultati accurati in pochi minuti.



Could we forget the history?

We only have to survive to the risk that an excessive automation may deprive the new generation of microbiology staff of its historical background.
Only keeping alive the historical microbiology bases the jump into the future will be without any precious loss. (Migliavacca 2017)



Grazie per l’attenzione