

Nuove frontiere nella diagnostica microbiologica

D. Colombrita¹, L. Bassani², A. Caruso²

¹U.O. Microbiologia e Virologia, Spedali Civili di Brescia

²Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia

Introduzione

Recentemente anche la diagnostica microbiologica si sta evolvendo verso tecniche più sofisticate ed automatizzate, nonostante gli impedimenti dovuti all'aumento dei costi di gestione per il laboratorio. Eppure la spesa per i diagnostici incide solo in percentuale molto bassa sulla spesa sanitaria globale, che potrebbe trarre, invece, dei vantaggi notevoli da una diagnostica più efficiente e da una migliore informatizzazione nel laboratorio di microbiologia, apportando una riduzione dei tempi di risposta oltre ad una maggiore efficacia terapeutica, riducendo così il costo globale, piuttosto che quello del singolo test. E' auspicabile quindi che il microbiologo diventi sempre più attento alle problematiche cliniche e che cerchi di risolverle in sinergia con il clinico ed il medico di base, con tutto l'ausilio che la tecnologia oggi può offrire.

I settori della microbiologia che hanno beneficiato maggiormente di queste nuove tecnologie sono stati: la sierologia, la batteriologia e la virologia.

SIEROLOGIA – Il settore della sierologia si occupa della diagnostica di malattie infettive tramite la ricerca di anticorpi specifici di classe IgM, IgA e IgG. Le metodiche che vengono comunemente utilizzate sono: test di immunofluorescenza indiretta, rapidi e alla portata di tutti i laboratori, test immunoenzimatici tipo ELISA che permettono di gestire anche le più grosse routine con l'ausilio di sistemi automatizzati, test di fissazione del complemento, test di immunodiffusione radiale e test di Western-blot, che con la loro elevata specificità, sono, in alcuni casi, degli indispensabili test di conferma, inoltre sono particolarmente importanti nell'esame di campioni provenienti da pazienti gravide perché permettono di evidenziare meglio il rischio di trasmissione materno-fetale.

In questi ultimi anni sono stati sviluppati strumenti provvisti di analizzatori capaci di gestire simultaneamente più parametri analitici in completa automazione, come l'identificazione del campione tramite codice a barre, il

trattamento del campione da provetta primaria, con prelievo, diluizione e dispensazione in micropiastra, la distribuzione dei reagenti con incubazione e lettura, la refertazione dei risultati e l'utilizzo di software per la gestione dei dati epidemiologici. Questi permettono di gestire delle grosse routine (processazione di centinaia di campioni in poche ore), una ottimizzazione dei flussi di lavoro e necessitano di personale ridotto rispetto alle metodiche non automatizzate.

BATTERIOLOGIA – L'avvento di nuovi strumenti automatizzati e l'evoluzione delle tecnologie⁽¹⁾ hanno permesso anche al settore della batteriologia di sostituire, in alcuni casi, le precedenti tecniche diagnostiche con altre più rapide, più sensibili e specifiche. I settori in cui si è ottenuto lo sviluppo più significativo sono quelli riguardanti la ricerca di batteri, miceti e micobatteri da emocolture, quelli per la ricerca di micobatteri da materiali vari, i sistemi per l'identificazione batterica e l'antibiogramma ed altri come il Breath-test, di diagnosi non invasiva per *Helicobacter pylori*.

Sistemi parzialmente automatizzati per la gestione delle emocolture sono in uso già da diversi anni, ma solo recentemente si sono sviluppati strumenti in grado di processare contemporaneamente centinaia di emocolture con letture continue, ogni 10 minuti (24 ore su 24), in grado di rilevare e di segnalare la positività del campione automaticamente, in tempi più rapidi e senza nessuna manipolazione da parte dell'operatore, con gestione computerizzata e collegamento con il computer centrale⁽²⁾.

Anche per l'identificazione e l'antibiogramma sono stati sviluppati sistemi come il VITEK2⁽³⁾, che grazie ad un alto livello di automazione consente di garantire una maggiore standardizzazione del metodo, con riduzione degli errori, una maggiore sicurezza per l'operatore e una riduzione dei tempi di risposta. E' possibile infatti avere un referto definitivo in giornata per almeno il 70% dei microrganismi isolati, rispetto alle 24-48 ore necessarie con altri metodi. Inoltre, grazie ad un software molto

sofisticato, permette la segnalazione del fenotipo del germe identificato, quindi tutti i meccanismi di resistenza ad esso legati, per una risposta terapeutica più utile per il clinico. E' anche possibile collegare il programma di gestione di tale sistema con un programma di sorveglianza epidemiologica, in grado di avvertire i reparti dell'insorgenza di una particolare resistenza batterica o di un'infezione ospedaliera in atto.

Un altro esempio di efficienza diagnostica può essere quello del Breath-test⁽⁴⁾ o test del respiro, un metodo di elevata sensibilità e specificità, che consente di fare diagnosi di *Helicobacter pylori* nella mucosa gastrica con un prelievo semplicissimo: respirando in due provette, prima e dopo la somministrazione di una bevanda marcata con un isotopo radioattivo, innocuo. Un analizzatore, in grado di analizzare 80 campioni per volta, permette di avere in breve tempo l'esito dell'esame.

Questa metodica, di ultima generazione, è estremamente affidabile e può essere utilizzata per la diagnosi e per il follow-up di pazienti sottoposti a regime terapeutico, riducendo l'utilizzo della gastroscopia, metodo invasivo e più costoso.

VIROLOGIA – La virologia è passata, invece, dalle classiche colture cellulari che restano comunque, in qualche caso, il metodo di riferimento, al microscopio elettronico e all'immunofluorescenza diretta, che ricerca l'antigene grazie all'impiego di anticorpi monoclonali, fino alle sofisticate e costose tecniche di biologia molecolare che possono essere utilizzate non solo in virologia ma anche in batteriologia, parassitologia e micologia. Si tratta di tecniche con elevata sensibilità, specificità e rapidità di risposta che stanno sostituendo le tecniche tradizionali, soprattutto nel campo della virologia, dove la ricerca del virus tramite colture cellulari necessita, in alcuni casi, di 15-20 giorni per l'esito, mentre la biologia molecolare permette al microbiologo di dare delle risposte anche in poche ore.

Le procedure di biologia molecolare prevedono: l'estrazione dell'acido nucleico (DNA o RNA target) direttamente dal materiale clinico, la sua amplificazione mediante PCR e la rivelazione dell'amplificato, fino ad arrivare alla REAL-TIME PCR⁽⁵⁾, tecnica molto recente che permette non solo la rivelazione dell'amplificato, ma anche la sua quantificazione in tempo reale, ossia durante la fase esponenziale dei cicli di PCR.

L'informatizzazione in microbiologia

L'utilizzo di sistemi informatici in microbiologia, oltre

ad agevolare la gestione interna del laboratorio con l'accettazione del paziente, creazione di piani di lavoro per indagine e per materiale, inserimento ed elaborazione dei risultati, refertazione ed infine archiviazione dei dati che possono essere utilizzati per studi epidemiologici, dovrebbe consentire il collegamento bi-direzionale tra laboratorio e reparti di degenza, con inter-scambio di tutte le informazioni utili ai fini della terapia ed invio in tempo reale degli esiti di laboratorio, che altrimenti verrebbero inviati in tempi molto più lunghi. Dovrebbe consentire pure il collegamento tra laboratorio e strutture sanitarie esterne all'azienda in modo che vi sia un continuo feed-back tra specialisti ospedalieri e sanitari.

Conclusioni

E' necessario tener presente che ridurre i singoli costi, senza considerare tutto il contesto in cui questi si inseriscono, potrebbe pregiudicare seriamente la qualità dei servizi e che tali servizi sono indispensabili per la cura dei pazienti.

E' inoltre vero che l'utilizzo di tecnologie più avanzate porta ad un aumento dei costi di gestione per il laboratorio, che vengono però ampiamente recuperati, grazie ad un aumento del numero degli esami e riduzione dei loro tempi di risposta, un'ottimizzazione del flusso di lavoro e diagnosi più rapide ed efficaci, terapie appropriate in tempi brevi con riduzione dei tempi di ricovero. Tutto ciò contribuisce all'ottimizzazione della spesa globale e del rapporto costo/beneficio, oltre a consolidare la fiducia del cittadino/utente nel medico, nei servizi sanitari e nelle strutture ospedaliere.

Bibliografia

1. Integrating Automation in a Microbiology Laboratory R. Auckenthaler - *Eccmid* 1997
2. The impact of blood culture reporting and clinical liaison on the empiric treatment of bacteremia. R. Canney et al. – *J. Clin. Pathology* – N.50 1997
3. The Role of Automation and Molecular Technology in Antimicrobial Susceptibility Testing D. Sahn - *Eccmid* 1997
4. Diagnostica microbiologica e "Urea Breath test" D. Colombrita et al. – *Bollettino di microbiologia e indagini di laboratorio news* – N.2 Maggio-Agosto 2000
5. Real-time monitoring of DNA amplification reactions *Biotechnology* - N.11 1993