



18

21-24 NOVEMBRE 2023
AREZZO FIERE E CONGRESSI

Gian Maria Rossolini

Dip. Medicina e Clinica Università di Firenze e SOD Microbiologia, AOU Careggi, Firenze

Ruolo e prospettive della genomica nella sorveglianza e nella diagnostica delle infezioni da batteri MDR

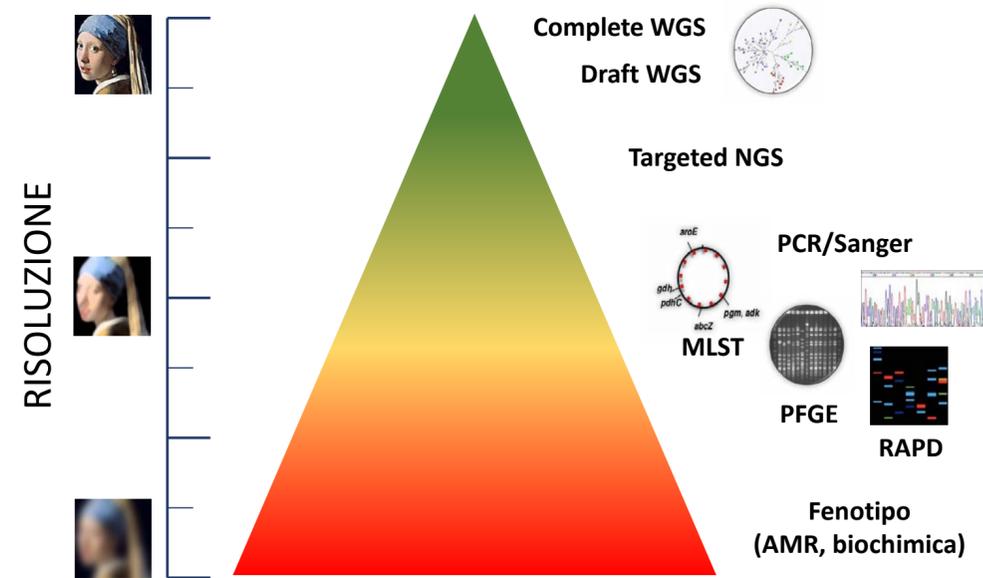


Gian Maria Rossolini
Dip. Medicina Sperimentale e Clinica
Università di Firenze
SOD Microbiologia e Virologia
AOU Careggi, Firenze



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, Viatrix

**La genomica nella sorveglianza microbiologica
(sorveglianza epidemiologica / outbreak tracing)**



Cortesia di Vincenzo Di Pilato (modificata)

RAPID COMMUNICATIONS

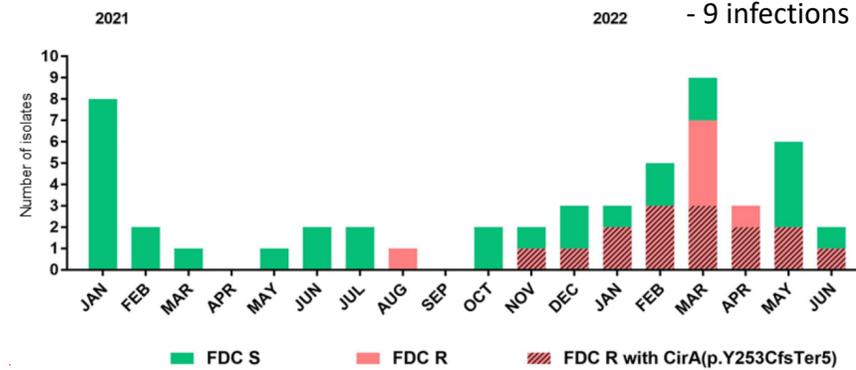


Nosocomial outbreak by NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* highly resistant to cefiderocol, Florence, Italy, August 2021 to June 2022

Oct 2022

Marco Coppi^{1,2}, Alberto Antonelli^{1,2}, Claudia Niccolai¹, Andrea Bartolini¹, Laura Bartolini², Maddalena Grazzini¹, Elisabetta Mantengoli^{1,4}, Alberto Farese⁴, Filippo Pieralli⁵, Maria Teresa Mechi³, Vincenzo Di Pilato^{2,4}, Tommaso Gianini^{1,2}, Gian Maria Rossolini^{1,2}

Since August 2021:
21 cases of FDC-R NDM-Kp
 - 12 colonizations
 - 9 infections (BSI, UTI, LRTI)



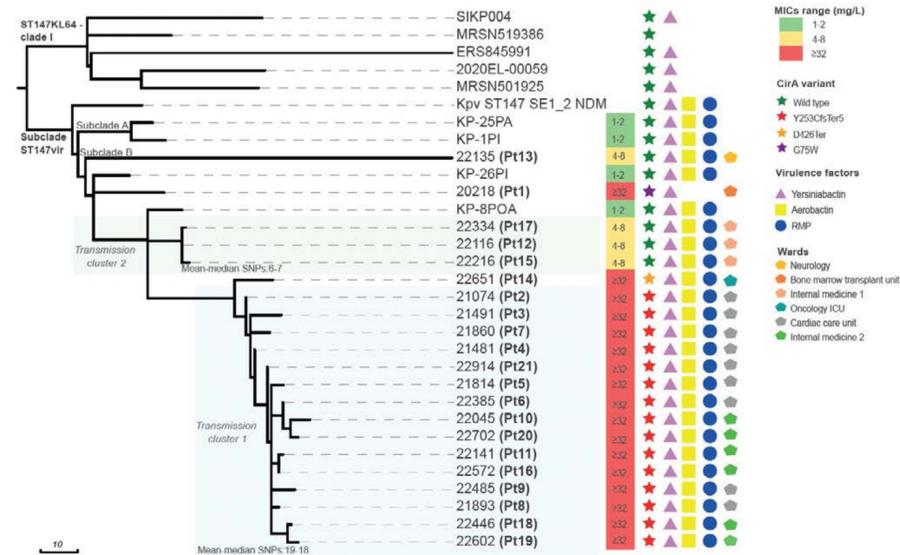
RAPID COMMUNICATIONS



Nosocomial outbreak by NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* highly resistant to cefiderocol, Florence, Italy, August 2021 to June 2022

Oct 2022

Marco Coppi^{1,2}, Alberto Antonelli^{1,2}, Claudia Niccolai¹, Andrea Bartolini¹, Laura Bartolini², Maddalena Grazzini¹, Elisabetta Mantengoli^{3,4}, Alberto Farese⁴, Filippo Pieralli⁵, Maria Teresa Mechi³, Vincenzo Di Pilato^{4,6}, Tommaso Giani^{1,2}, Gian Maria Rossolini^{1,2}



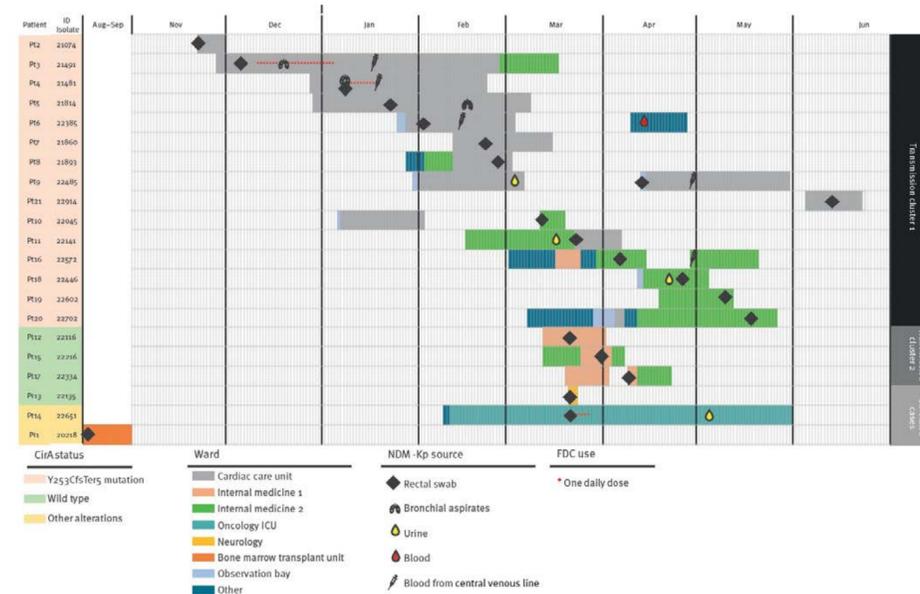
RAPID COMMUNICATIONS



Nosocomial outbreak by NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* highly resistant to cefiderocol, Florence, Italy, August 2021 to June 2022

Oct 2022

Marco Coppi^{1,2}, Alberto Antonelli^{1,2}, Claudia Niccolai¹, Andrea Bartolini¹, Laura Bartolini², Maddalena Grazzini¹, Elisabetta Mantengoli^{3,4}, Alberto Farese⁴, Filippo Pieralli⁵, Maria Teresa Mechi³, Vincenzo Di Pilato^{2,4}, Tommaso Gianì^{1,2}, Gian Maria Rossolini^{1,2}



WGS nella diagnostica microbiologica

Clinical Microbiology and Infection 24 (2018) 355–360



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com



Review

Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology

J.W.A. Rossen^{1,2,*}, A.W. Friedrich¹, J. Moran-Gilad^{2,3,4}, on behalf of the ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics (ESGMD)

- **Tempi di risposta**
- **Automazione**
- **Actionability dei risultati**
- **Laboriosità**
- **Standardizzazione**
- **Costi**

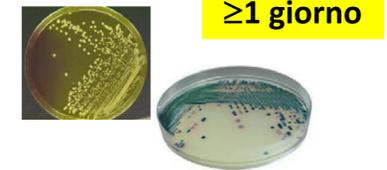
Esame colturale con antibiogramma fenotipico: il riferimento nella diagnostica microbiologica

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

- Lentezza (≥ 2 giorni)
- Patogeni difficilmente / non coltivabili



• isolamento in coltura ≥ 1 giorno



• identificazione



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



≥ 1 giorno

Diagnostica genotipica *targeted* (per patogeni / geni di resistenza)

Es. test NAAT per CPE



KPC
OXA-48
NDM
VIM
IMP-1

Campione: tamp. rettale TTR: 50 min

Es. pannello sindromico per polmoniti



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

Campione: BAL, BAS/TAS TTR: 70 min

VANTAGGI

- **Rapidità (anche da campione clinico / emocoltura positiva)**
- **Sensibilità (patogeni *fastidious*, pregressa antibiotici)**
- **Automazione, sistemi *standalone* (possibile delocalizzazione)**

Diagnostica genotipica *targeted* (per patogeni / geni di resistenza)

Es. test NAAT per CPE



KPC
 OXA-48
 NDM
 VIM
 IMP-1

Campione: tamp. rettale TTR: 50 min

Es. pannello sindromico per polmoniti



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

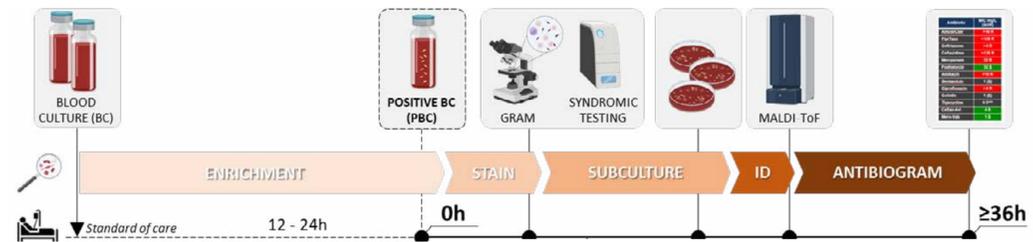
Campione: BAL, BAS/TAS TTR: 70 min

LIMITI

- **Patogeni / geni di resistenza *off-target***
- **Discrepanze genotipo-fenotipo di resistenza**
 - geni di resistenza inattivati
 - aumento dosaggio genico
 - mutazioni puntiformi *gain/loss of function*

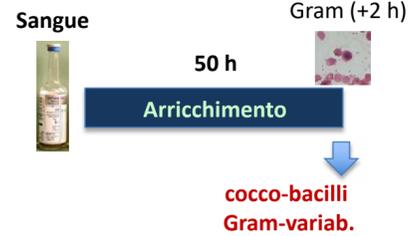
Potenzialmente superabili con analisi genomica (*sequencing*)

Fast LC-WGS nella diagnostica delle BSI



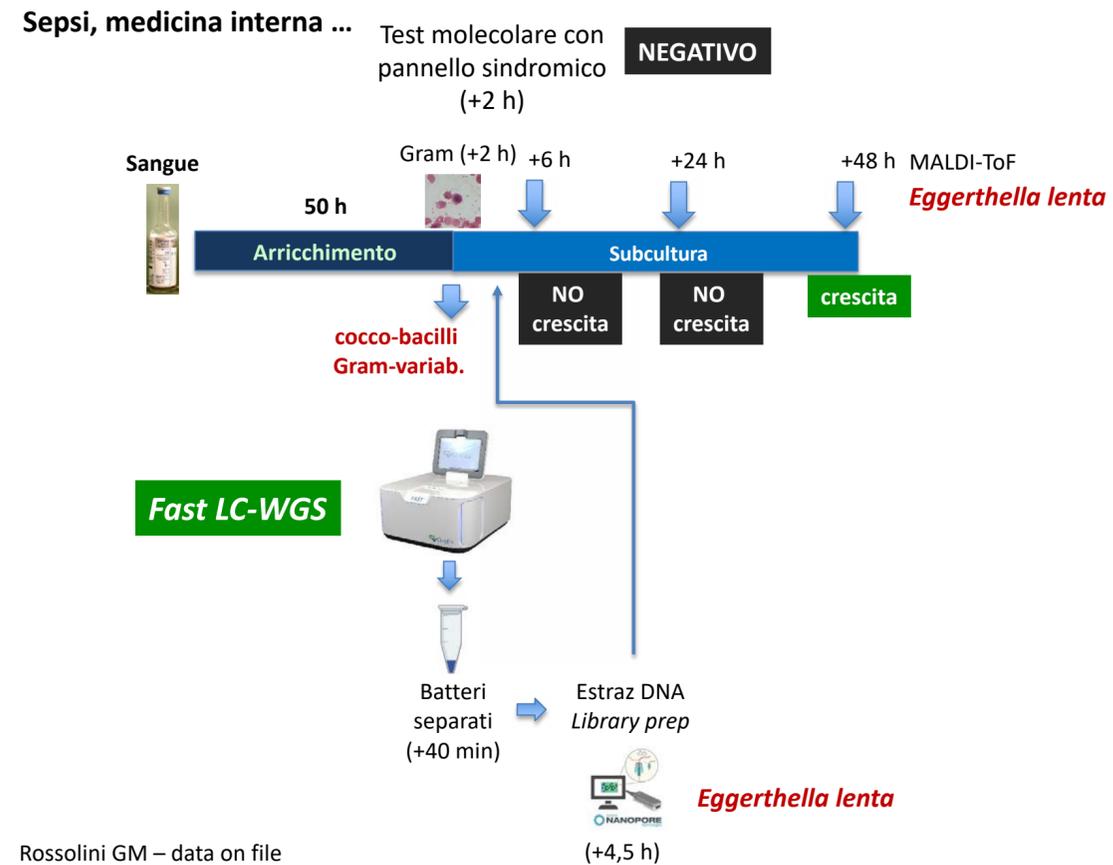
Di Pilato *et al* – in preparation

Sepsi, medicina interna ... Test molecolare con pannello sindromico (+2 h)

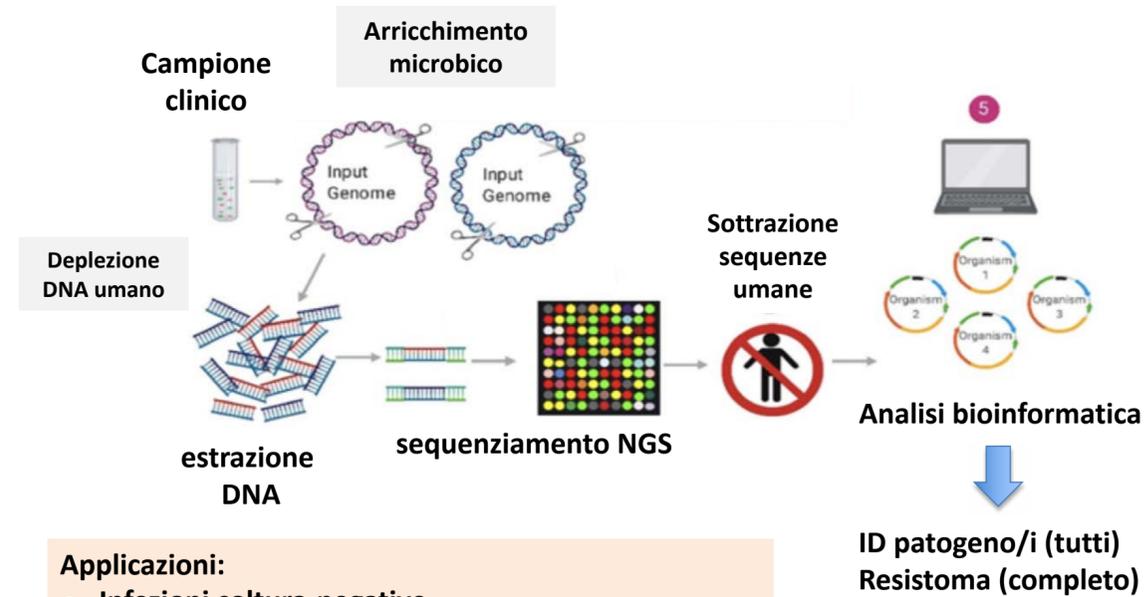


Gram+ Bacteria	
<i>Enterococcus faecalis</i>	NON RILEVATI
<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Gram- Bacteria	
<i>Acinetobacter calcoaceticus- baumannii complex</i>	NON RILEVATI
<i>Bacteroides fragilis</i>	
Enterobacterales	
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae group</i>	
<i>Proteus</i>	
<i>Salmonella</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
Yeast	
<i>Candida albicans</i>	NON RILEVATI
<i>Candida auris</i>	
<i>Candida glabrata</i>	
<i>Candida krusei</i>	
<i>Candida parapsilosis</i>	
<i>Candida tropicalis</i>	
<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	

Rossolini GM – data on file



Metagenomica *shotgun*



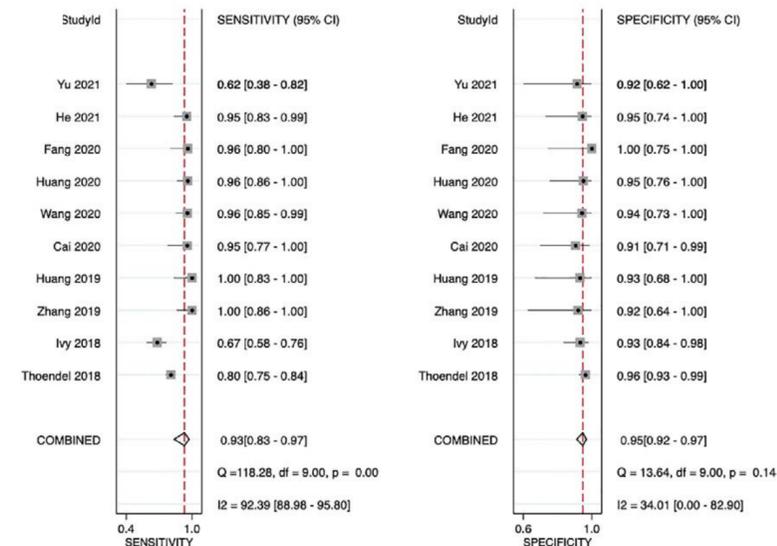
- Applicazioni:**
- Infezioni coltura-negative
 - Infezioni con eziologie complesse (es. infezioni protesiche, ascessi, meningiti, endocarditi, polmoniti ...)

Kullar *et al* – Clin Infect Dis 2023
 Higgins *et al* – J Clin Micro 2022

The Effectiveness of Metagenomic Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis

Jun Tan¹, Yang Liu², Sabrina Ehner³, Andreas K. Nissler³, Yang Yu¹, Jianzhong Xu^{1*} and Tao Chen^{1*}

- 10 studi, 995 pazienti (2018 - 2021)
- Metagenomica ha identificato uno o più patogeni nel 54% dei casi di PJI coltura-negative



2019

Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection

Themoula Charalampous^{1,8}, Gemma L. Kay^{1,2,8}, Hollian Richardson^{1,8}, Alp Aydin², Rossella Baldan^{1,3}, Christopher Jeanes⁴, Duncan Rae⁴, Sara Grundy⁴, Daniel J. Turner⁵, John Wain^{1,2}, Richard M. Leggett⁶, David M. Livermore^{1,7} and Justin O'Grady^{1,2*}

- Optimized protocol, ca. 6 hrs
- Sensitivity vs. culture 96.6%
- Additional pathogens not detected by culture (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae*, *S.pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus*) in 15/41 samples (7 negative by culture)

Conclusioni

- Ruolo consolidato di WGS per *outbreak tracing* e per sorveglianza microbiologica (inclusi patogeni MDR)
- Importanza di valorizzare il significato del dato genomico con metadati clinici, fenotipici e organizzativi
- Crescente ruolo della genomica in diagnostica microbiologica (superamento limiti di diagnostica colturale e di diagnostica genotipica *targeted*)
- Ancora alcuni limiti per uso in diagnostica microbiologica routinaria (laboriosità, costi, tempi di risposta)
- Impatto su aspetti organizzativi / competenze tecniche e interpretative necessarie nel laboratorio di microbiologia clinica

Delitti in materia di violazione del diritto d'autore (Art. 25-novies, D.Lgs. n. 231/2001) [articolo aggiunto dalla L. n. 99/2009]

- Messa a disposizione del pubblico, in un sistema di reti telematiche, mediante connessioni di qualsiasi genere, di un'opera dell'ingegno protetta, o di parte di essa (art. 171, legge n.633/1941 comma 1 lett. a) bis)
- Reati di cui al punto precedente commessi su opere altrui non destinate alla pubblicazione qualora ne risulti offeso l'onore o la reputazione (art. 171, legge n.633/1941 comma 3)
- Abusiva duplicazione, per trarne profitto, di programmi per elaboratore; importazione, distribuzione, vendita o detenzione a scopo commerciale o imprenditoriale o concessione in locazione di programmi contenuti in supporti non contrassegnati dalla SIAE; predisposizione di mezzi per rimuovere o eludere i dispositivi di protezione di programmi per elaboratori (art. 171-bis legge n.633/1941 comma 1)
- Riproduzione, trasferimento su altro supporto, distribuzione, comunicazione, presentazione o dimostrazione in pubblico, del contenuto di una banca dati; estrazione o reimpiego della banca dati; distribuzione, vendita o concessione in locazione di banche di dati (art. 171-bis legge n.633/1941 comma 2)
- Abusiva duplicazione, riproduzione, trasmissione o diffusione in pubblico con qualsiasi procedimento, in tutto o in parte, di opere dell'ingegno destinate al circuito televisivo, cinematografico, della vendita o del noleggio di dischi, nastri o supporti analoghi o ogni altro supporto contenente fonogrammi o videogrammi di opere musicali, cinematografiche o audiovisive assimilate o sequenze di immagini in movimento; opere letterarie, drammatiche, scientifiche o didattiche, musicali o drammatico musicali, multimediali, anche se inserite in opere collettive o composite o banche dati; riproduzione, duplicazione, trasmissione o diffusione abusiva, vendita o commercio, cessione a qualsiasi titolo o importazione abusiva di oltre cinquanta copie o esemplari di opere tutelate dal diritto d'autore e da diritti connessi; immissione in un sistema di reti telematiche, mediante connessioni di qualsiasi genere, di un'opera dell'ingegno protetta dal diritto d'autore, o parte di essa (art. 171-ter legge n.633/1941)
- Mancata comunicazione alla SIAE dei dati di identificazione dei supporti non soggetti al contrassegno o falsa dichiarazione (art. 171-septies legge n.633/1941)
- Fraudolenta produzione, vendita, importazione, promozione, installazione, modifica, utilizzo per uso pubblico e privato di apparati o parti di apparati atti alla decodificazione di trasmissioni audiovisive ad accesso condizionato effettuate via etere, via satellite, via cavo, in forma sia analogica sia digitale (art. 171-octies legge n.633/1941).

[Torna all'inizio](#)