Corso precongressuale A

Sostenibilità, fattibilità e strategie da adottare nella diagnostica parassitologica

La difficoltà nel mantenere la diagnosi tradizionale per ridotta esperienza

RAFFAELE GARGIULO

Linee Guida Operative per la diagnosi delle Parassitosi Intestinali

Francesco Bernieri, Pietro Casella, Daniele Crotti, Vincenzo Cutrupi, Daniela Galli, Luigi Di Matteo, Annibale Raglio

Comitato di Studio per la Parassitologia dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI-CoSP)

INDICE

PRESENTAZIONE
INTRODUZIONE
1. L'ESAME COPROPARASSITOLOGICO
2. PROCEDURE DIAGNOSTICHE & LINEE GUIDA OPERATIVE
3. TEMPI ANALITICI & REFERTAZIONE
APPENDICE
BIBLIOGRAFIA
ALLEGATI

LEGENDA: Le raccomandazioni sono riportate all'interno di un rettangolo, seguite da una lettera maiuscola per esprimere la **Forza della**

Raccomandazioni

- Quali tecniche utilizzare per effettuare un **Esame Coproparassitologico Standard**.
- Effettuare sempre la **Concentrazione** Formolo Etere - Etil Acetato su ogni campione fecale da sottoporre a ricerca dei parassiti nelle feci.
- Effettuare sempre una **colorazione permanente** quale necessario completamento della ricerca dei parassiti nelle feci.
- Conoscere i limiti della Concentrazione e le indicazioni per ricerche mirate di alcuni parassiti (*Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*, *Cryptosporidium parvum*, *Dientamoeba fragilis*).
- Cosa riportare su un referto coproparassitologico.

GUIDA

Diagnosi delle parassitosi intestinali

Esame coproparassitologico standard

Scotch test

Ai fini di una corretta diagnosi può essere necessario analizzare più campioni fecali (da 2 a 6, mediamente 3), possibilmente raccolti a giorni alterni.

Diagnosi delle parassitosi intestinali

Esame coproparassitologico standard

PROTOZOI	ELMINTI
Trofozoiti	Uova
Cisti	Larve
Oocisti	Proglottidi

Consiste almeno di un **esame microscopico diretto**, un **esame microscopico dopo concentrazione** e una **colorazione permanente** (Ova & Parasites: O&P).

Linee guida CoSP AMCLI

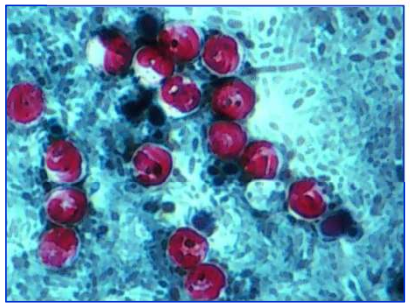
Tecnica	Indicazioni
Esame macroscopico	- rilevare se feci formate o diarroiche - evidenziare elminti e/o parti di essi
Esame microscopico diretto	- evidenziare protozoi (soprattutto i trofozoiti) ed elminti
Esame microscopico dopo concentrazione	- utile per elminti e protozoi
Scotch Test	- test di riferimento per *E. vermicularis* - può essere utile per *Taenia* spp
Colorazione Tricromica o Ematossilina ferrica	- protozoi (coccidi esclusi)
Colorazione di Giemsa	- *G. intestinalis, Dientamoeba fragilis*
Metodo di Baermann	- larve di *S. stercoralis*
Coltura su agar	- *S. stercoralis*, *N. americanus*, *A. duodenale*, *Trichostrongylus* spp.
Colorazioni Alcool-Acido resistenti	- oocisti di *Cryptosporidium* spp., altri coccidi
Colorazione Tricromica modificata	- spore di microsporidi

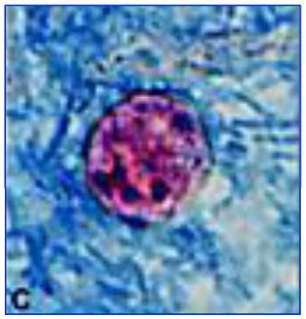
Microbiologia Medica 2005, 20

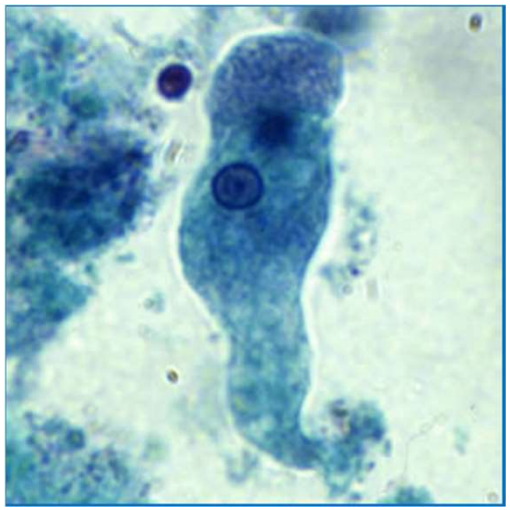
Diagnosi delle parassitosi intestinali

Ricerche specifiche

- Larve di *S. stercoralis*
- Oocisti di *Cryptosporidium sp*, *C. belli*, *C. cayetanensis*
- Cisti e trofozoiti di *E. histolytica*
- Uova *S.mansoni*







ESEMPI DI ISTRUZIONI PER I PAZIENTI

Tabella 1. Istruzioni per la raccolta delle feci.

ESAME COPROPARASSITOLOGICO STANDARD

N.B.: si raccomanda di raccogliere 3 campioni di feci emesse a giorni alterni

1) Le feci vanno raccolte su una superficie asciutta e pulita, tipo una padella da letto, oppure un foglio di cartone o giornale ripiegato, o un sacchetto di plastica, posti sotto il copri water.
   N.B.: le feci non vanno contaminate né con le urine né con l'acqua del water.
2) Le feci vanno prelevate in punti diversi dell'intera evacuazione. Trasferire in un adeguato contenitore (di plastica, fornito dal laboratorio o acquistato in farmacia), utilizzando una spatola o una bacchetta di legno o una posata di plastica, una quantità di feci pari almeno al volume di una grossa noce.
   N.B.: se le feci sono non formate/diarroiche raccogliere almeno 5-10 ml di materiale fecale.
3) Chiudere molto bene il contenitore ed etichettarlo con cognome e nome, data di nascita, data e ora dell'emissione delle feci.
4) Consegnare il campione al laboratorio entro 2-4 ore dalla raccolta oppure conservarlo in frigorifero per non più di 24 ore.
   ATTENZIONE: se le feci sono liquide il campione deve pervenire al laboratorio entro 30-60 minuti dalla loro emissione!

PRECAUZIONI IMPORTANTI

a) Alcuni giorni prima e durante il periodo della raccolta delle feci non fare uso di lassativi, antidiarroici, antimicrobici, o di altre sostanze interferenti come bario, bismuto, oli minerali.
b) Alcuni giorni prima e durante il periodo della raccolta delle feci si consiglia di seguire un regime dietetico che prevede di evitare: legumi e frutta secca, frutti e verdure a cuticola resistente (pesche, albicocche, pomodori, pere, fragole, fichi), carote e banane.

Tabella 2. Istruzioni per l'esecuzione dello Scotch Test

ESECUZIONE DELLO SCOTCH TEST PER LA RICERCA SPECIFICA DI
ENTEROBIUS VERMICULARIS (OSSIURI)

N.B.: si raccomanda di eseguire 3 scotch test preferibilmente a giorni alterni.

ATTENZIONE:

- la raccolta deve essere eseguita al momento del risveglio mattutino, prima che il soggetto defechi e si lavi
- utilizzare **nastro adesivo** (**scotch**) **trasparente**
- ritirare il materiale necessario (vetrini e abbassalingua) in laboratorio

1) Tagliare con le forbici un pezzo di nastro adesivo (5-6 cm) un poco più corto del vetrino fornito dal laboratorio.
2) Con l'aiuto di un abbassalingua (o del manico di un cucchiaio) appoggiare il nastro adesivo sull'orifizio anale comprimendo bene sulle pliche perianali per circa 15-20 secondi.
3) Staccare il nastro adesivo dall'orifizio anale ed applicarlo ben steso sul vetrino.
4) Identificare il vetrino con cognome e nome e data del prelievo.
5) Consegnare il campione al laboratorio entro 2-4 ore dal prelievo oppure conservarlo in frigorifero per non più di 24-48 ore.

ATTENZIONE:

DOPO IL PRELIEVO LAVARSI BENE LE MANI
(le uova sono spesso già embrionate e infestanti).

Scheda raccolta dati

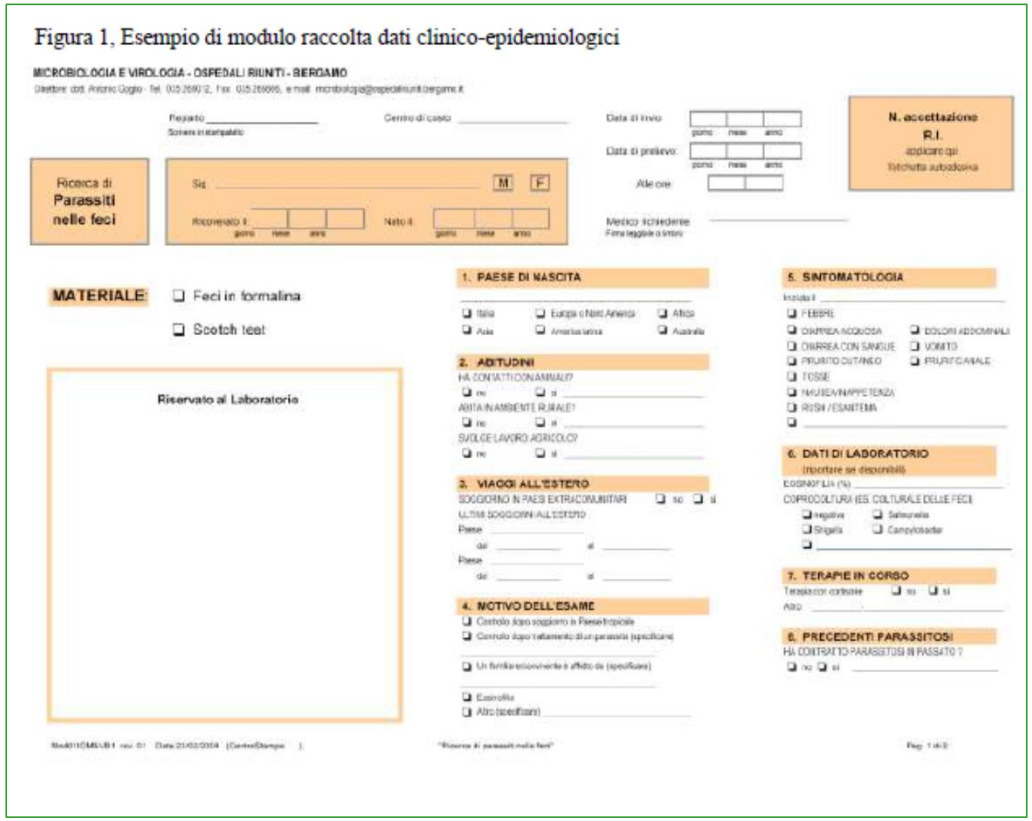


Figura 1, Esempio di modulo raccolta dati clinico-epidemiologici

MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA - OSPEDALI RIUNITI - BERGAMO

Ricerca di Parassiti nelle feci

N. accettazione R.I.

MATERIALE
- Feci in formalina
- Scotch test

Riservato al Laboratorio

1. PAESE DI NASCITA
2. ABITUDINI
3. VIAGGI ALL'ESTERO
4. MOTIVO DELL'ESAME
5. SINTOMATOLOGIA
6. DATI DI LABORATORIO
7. TERAPIE IN CORSO
8. PRECEDENTI PARASSITOSI

- Dati clinici
- Sintomatologia
- Dati geografici
- Viaggi all'estero
- Abitudini alimentari
- Stato immunitario
- Terapie in atto
- Adozioni internazionali
- Altre informazioni

Un rapporto di **stretta collaborazione** tra clinico e microbiologo è fondamentale per ottenere risultati più performanti in tempi ottimali!

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Unità Sanitaria Locale di Modena

Nuovo Ospedale Civile S.Agostino - Estense
Dipartimento di Patologia Clinica
S.C. Corelab e Microbiologia
Laboratorio di Microbiologia Clinica

ESAME PARASSITOLOGICO DELLE FECI: DATI ANAMNESTICI

NOME [redacted]

COGNOME [redacted]

DATA DI NASCITA [redacted]

AMBULAT. / C. PRELIEVI

IN ALTERNATIVA ALLA COMPILAZIONE DEI DATI ANAGRAFICI APPLICARE QUI L'ETICHETTA DI PRENOTAZIONE

Motivazioni che hanno portato alla richiesta dell'esame :

Diarrea acuta	
Diarrea cronica (da più di 15 gg)	
Mal di pancia	
Prurito diffuso	
Prurito anale	
Orticaria	
Recente viaggio all'estero	
Altro : TEDIA	
Non so	

NOTA : si prega inserire il campione , la scheda e la richiesta nello stesso trans-bag

---

NOME [redacted]

COGNOME [redacted]

DATA DI NASC [redacted]

AMBULAT. / C. PRELIEVI [redacted]

Motivazioni che hanno portato alla richiesta dell'esame :

Diarrea acuta	
Diarrea cronica (da più di 15 gg)	
Mal di pancia	
Prurito diffuso	
Prurito anale	
Orticaria	
Recente viaggio all'estero	
Altro : METEORITE	X
Non so	

NOTA : si prega inserire il campione , la scheda e la richiesta nello stesso trans-bag

---

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Unità Sanitaria Locale di Modena

Nuovo Ospedale Civile S.Agostino - Estense
Dipartimento di Patologia Clinica
S.C. Corelab e Microbiologia
Laboratorio di Microbiologia Clinica

ESAME PARASSITOLOGICO DELLE FECI: DATI ANAMNESTICI

NOM [redacted]

COGNOME [redacted]

DATA DI NASCIT [redacted]

AMBULAT. / C. PRELIEVI [redacted]

IN ALTERNATIVA ALLA COMPILAZIONE DEI DATI ANAGRAFICI APPLICARE QUI L'ETICHETTA DI PRENOTAZIONE

Motivazioni che hanno portato alla richiesta dell'esame :

Diarrea acuta	
Diarrea cronica (da più di 15 gg)	
Mal di pancia	
Prurito diffuso	
Prurito anale	
Orticaria	
Recente viaggio all'estero	
Altro : ARIA ANOMALA MOLTO FORTE E PROLUNGATO	X
Non so	

NOTA : si prega inserire il campione , la scheda e la richiesta nello stesso trans-bag

Corretta interpretazione dei risultati

TABLE A5 Computer comments

Result or situation	Report comment(s)	Interpretation or discussion
Submission of stool specimens		
Submission of a single stool specimen for ova and parasite examination	One stool specimen is not sufficient for the recovery of intestinal parasites (only a 50% recovery); 2 specimens are recommended, while 3 offer the best chance of organism recovery	While 3 specimens collected over a 10-day period are the best approach, receipt of 2 specimens is acceptable
Submission of 2 stool specimens for ova and parasite examination	Although submission of 2 stool specimens is acceptable, 3 specimens collected over a 10-day period provide the best approach for organism recovery	While 2 specimens are now considered acceptable, 3 specimens will allow the most complete percentage recovery of intestinal parasites present
Examination of fecal specimens		
No parasites seen	Antibiotics such as metronidazole or tetracycline may interfere with the recovery of intestinal parasites, particularly the protozoa	If a patient is symptomatic and intestinal parasites are suspected, this comment may be helpful for the physician, particularly if the patient has received any of these antibiotics
Yeasts, budding yeast, and/or pseudohyphae	Reports of yeasts may or may not be clinically relevant due to possible specimen handling delays prior to fixation	Because yeasts can continue to grow within the stool prior to fixation, the results from the permanent-stain smear may or may not be clinically relevant; quantitate cells if the number is moderate or many or the cells are packed

TABLE A5 (Continued)

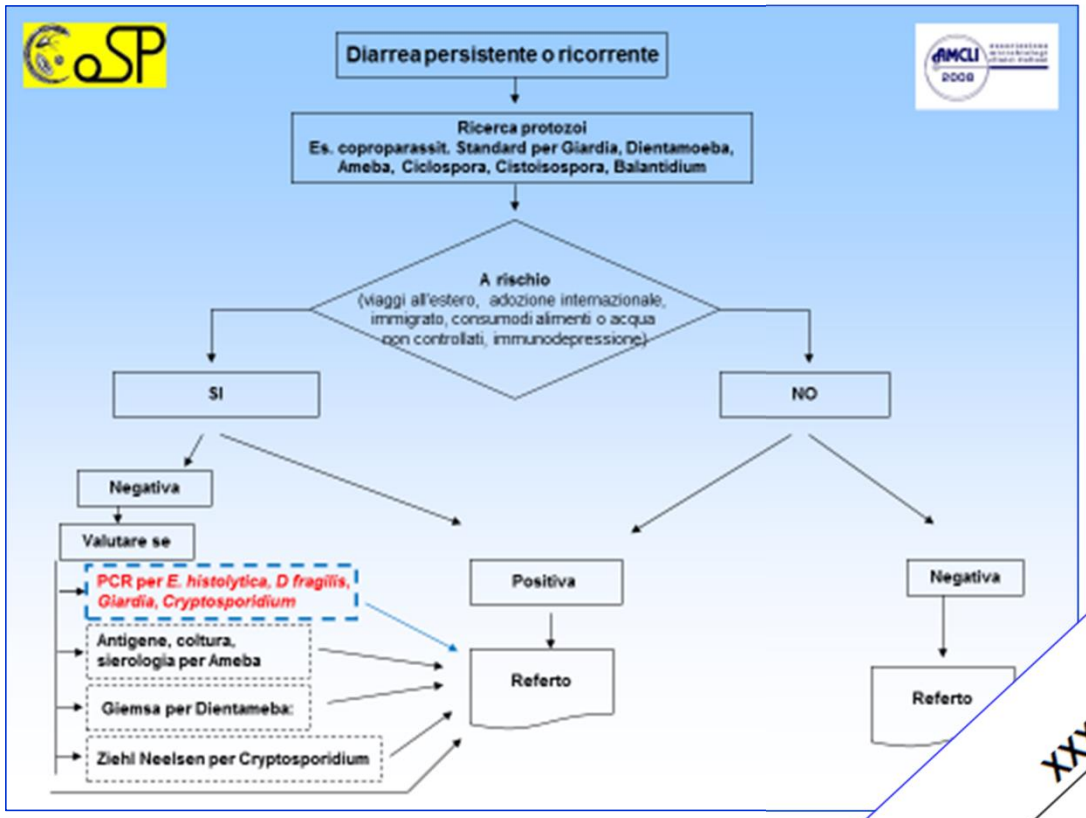
Result or situation	Report comment(s)	Interpretation or discussion
Trophozoites containing ingested RBCs (*Entamoeba histolytica*)	Pathogenic; cause of amoebiasis	A positive result is based on the presence of ingested RBCs within the trophozoite's cytoplasm and/or a fecal immunoassay specific for the pathogen is positive (*Entamoeba histolytica* positive)
Trophozoites containing no ingested RBCs and/or cysts (*Entamoeba histolytica/E. dispar* group)	Differentiation between the pathogen *Entamoeba histolytica* and the nonpathogen *Entamoeba dispar* is not possible based on organism morphology; if ingested RBCs are not seen or cysts are present, you will be unable to differentiate the two organisms	A fecal immunoassay specific for the pathogen, *Entamoeba histolytica*, can be performed on fresh stool to separate out *E. histolytica* and *E. dispar* An immunoassay for the *Entamoeba histolytica/E. dispar* group complex will not differentiate the true pathogen, *Entamoeba histolytica*
	You will be unable to determine pathogenicity from the organism's morphology or from the patient's clinical condition, and treatment may be appropriate	The fecal immunoassay specific for the pathogen *Entamoeba histolytica* requires fresh stool for testing (this can be added as another comment if you offer the differentiation test; see the entry below)
Differentiation of *E. histolytica* from *E. dispar*	To determine the presence or absence of pathogenic *Entamoeba histolytica*, submit a fresh stool specimen	The fecal immunoassay specific for the pathogen *Entamoeba histolytica* requires fresh stool for testing

TABLE A5 (Continued)

Result or situation	Report comment(s)	Interpretation or discussion
Blastocystis spp.	*Blastocystis* spp. contain ~10 human subtypes, none of which can be differentiated on the basis of organism morphology; some are pathogenic and some are nonpathogenic; if no other pathogens are found, *Blastocystis* may be the cause of patient symptoms and other organisms capable of causing diarrhea should also be ruled out	Until there are testing options to differentiate between the pathogenic and nonpathogenic subtypes, it is important that physicians know that some strains of *Blastocystis* are pathogenic; quantitate these organisms (rare, few, moderate, many, packed)
Entamoeba hartmanni, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba bütschlii*, *Chilomastix mesnili*, *Pentatrichomonas hominis*, *Enteromonas hominis*, *Retortamonas intestinalis*, trophozoites and/or cysts	Nonpathogenic; treatment is not recommended; however, recovery of these organisms indicates that the patient has ingested something contaminated with fecal material (by the same infectivity route for pathogens)	It is important to report nonpathogens; a patient may be infected with one or more pathogen(s) not yet found

Clin Microb Rev, jan 2018, 31:1

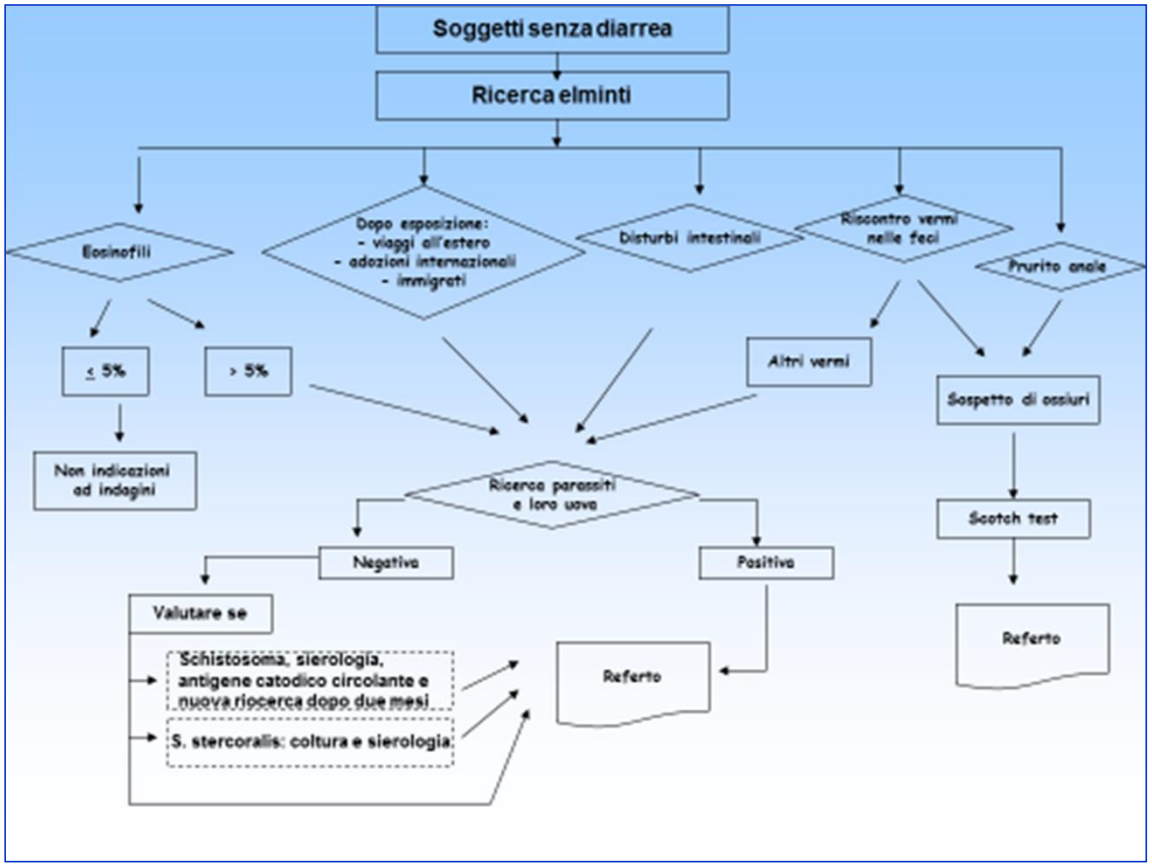
Dati clinici o epidemiologici	Commento
Malassorbimento, Meteorismo, Dimagrimento, Viaggio in aree ad elevato rischio	Per escludere un'infezione da *G. lamblia* può essere utile la ricerca di antigeni fecali o ripetere l'indagine su 6 o più campioni
Diarrea muco-ematica, Viaggio in aree ad alto rischio	Per escludere un'infezione da *E. histolytica* può essere utile la ricerca di antigeni fecali, di esame colturale e di ricerca di anticorpi
Diarrea ricorrente con esiti negativi per altri patogeni intestinali	Per escludere un'infezione da *Dientamoeba fragilis* è utile ripetere la ricerca su feci appena emesse con colorazione permanente (Giemsa o Tricromica)
Prurito anale e eosinofilia	Per escludere un'infezione da *E. vermicularis* si consiglia l'esecuzione di Scotch Test su almeno 3 campioni
Eosinofilia in soggetto con età superiore ai 60 anni e/o con attività lavorativa o ricreazionale (agricoltura, giardinaggio, hobby ecc.) a rischio (contatto con terreno)	Per escludere un'infezione da *S. stercoralis* è necessario eseguire esame colturale e/o ricerca di anticorpi e/o metodo di Baermann
Eosinofilia in soggetto immigrato o che riferisce contatto con acque dolci in zone endemiche per schistosomiasi	Per escludere un'infestazione da *Schistosoma* spp. può essere utile effettuare la ricerca di anticorpi
Adozione internazionale	Per completare la ricerca di parassiti intestinali può essere utile: la ricerca di antigeni per *G. lamblia* e *E. histolytica/E.dispar*, l'esame colturale per *E.histolityca*, la sierologia per Schistosomi



Proposta di Percorso Diagnostico presentato durante il
XXXVII Congresso Nazionale AMCLI - Stresa, 5-8 ottobre 2008

Revisione del Percorso diagnostico 2015

PARASSITOSI INTESTINALI: METODOLOGIE DIAGNOSTICHE


Soggetti senza diarrea
Ricerca elminti
Eosinofili
Dopo esposizione:
- viaggi all'estero
- adozioni internazionali
- immigrati
Disturbi intestinali
Riscontro vermi nelle feci
Prurito anale
≤ 5%
> 5%
Altri vermi
Sospetto di ossiuri
Non indicazioni ad indagini
Ricerca parassiti e loro uova
Scotch test
Negativa
Positiva
Valutare se
Schistosoma, sierologia, antigene catodico circolante e nuova ricerca dopo due mesi
S. stercoralis: coltura e sierologia
Referto
Referto

XLV Congresso Nazionale

AMCLI

RIMINI, 6 - 9 Novembre 2016
Palacongressi

EPIDEMIOLOGIA DELLE PARASSITOSI IN ITALIA:

risultati della terza indagine nazionale

AMCLI - CoSP

UPDATE IN PARASSITOLOGIA: EPIDEMIOLOGIA E RICERCA

Daniele Crotti (Perugia)
Raffaele Gargiulo (Modena)

Comitato di Studio per la Parassitologia
ASSOCIAZIONE MICROBIOLOGI CLINICI ITALIANI

Adesioni iniziali: 29 laboratori diagnostici

Adesioni effettive: 29 laboratori diagnostici

Nord	Centro	Sud e Isole	Totali
22	4	3	29
Lombardia: 11 Veneto: 4 Friuli VG: 2 Alto Adige: 2 Trentino: 1 Piemonte: 1 Liguria: 1	Emilia Romagna: 2 Toscana: 2	Basilicata: 1 Campania: 1 Sardegna: 1	

Periodo di studio dell'indagine: 12 mesi
giugno/luglio 2015 – maggio/giugno 2016

Indagini eseguite per l'O&P in 29 labor

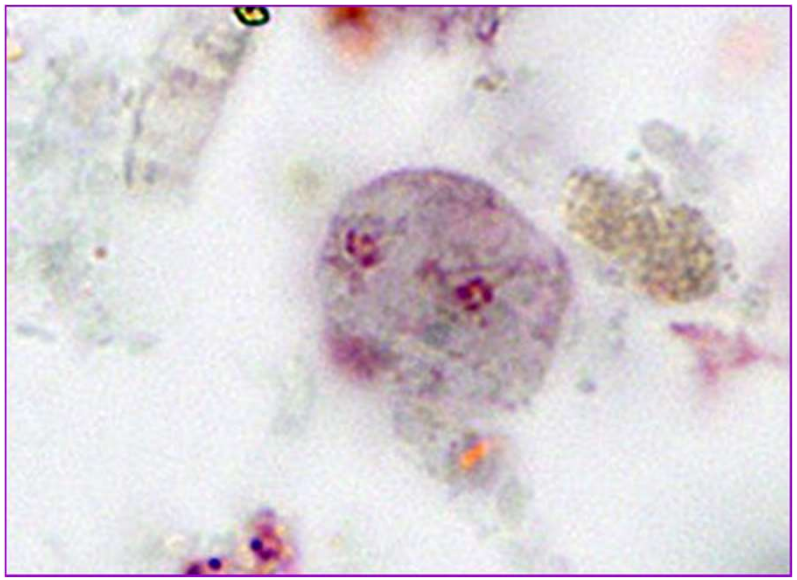
	FEA #	Col.ne ^ estemporanea	Col.ne ° permanente	Ric. * antigeni
SI	29 #	19 ^	18 °	20 *
Non sempre/talora		-	-	
NO/non riferito	-	10	11	9

Note:

Dientamoeba fragilis

- Colorazione permanente:
  Giemsa
  Tricromica

- PCR home made



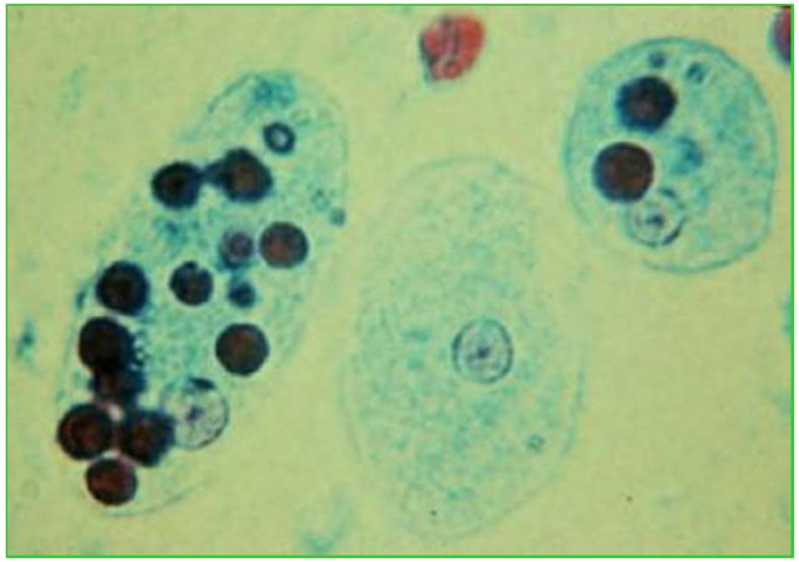
Effettuata solo da **18** laboratori su 29 partecipanti

Entamoeba histolytica/dispar

Ricerca mirata/dettagliata in *15 centri diagnostici*
di
Entamoeba histolytica –
E. histolytica/dispar

Note: ?

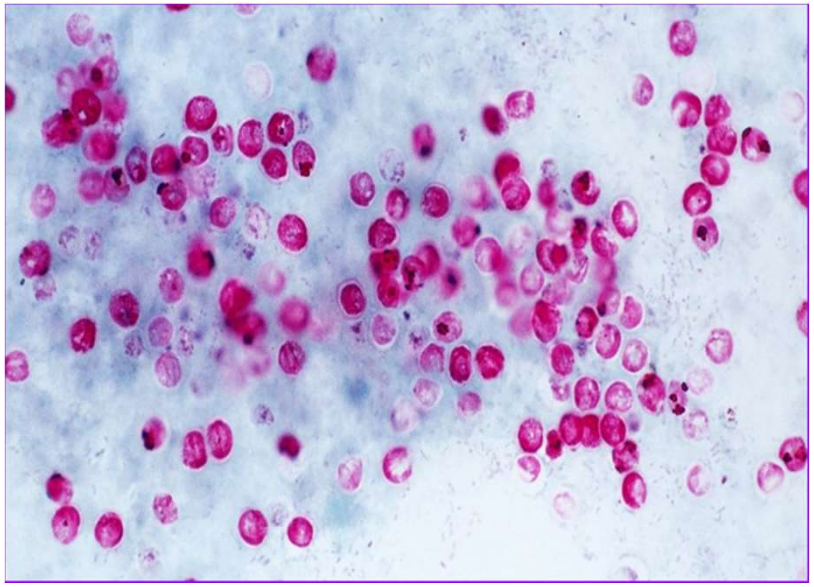
^ ICT-Ag;
*Immunocard Stat CGE (+PCR homemade);
^^TRIAGE;
! Biosite immunocromatografia;
°arancio d'acridina;
EIA rapido Techlab;
§ Immunocromatografia non specificata;
& Biologia Molecolare fatta in casa;
# immunocromatografia Meridian;
§ ICT Techlab;
!ICT Alere e ELISA Scimdex;
@ ELISA NS



Ricerca mirata/finalizzata di *Cryptosporidium* spp.

(21 laboratori)

Esaminati	POSITIVI
6850 con criteri vari (vedi dopo)	21 0.3 %



Ricerca mirata e dettagliata di *Cryptosporidium* spp.

Note: ?

^ ICT-Ag/IF diretta;
* ZN mod.to;
^^ Immunocard Stat CGE Meridian;
° auramina-rodamina;
** ICT Meridian;
§ Immunocromatogrfaia non specificata;
= immunocromat. Trinity Biotech;
&: biologia molecolare fatta in casa;
§ ICT Techlab;
! Kynioun;
@ ELISA NS;
$ RT-PCR (Seegene).

! 6 mesi (1 laboratorio; 20 laboratori: 12 mesi)

Strongyloides stercoralis

- Coltura su agar
- Baermann
- Baermann modificato

Effettuata solo da **18** laboratori su 29 partecipanti

Vantaggi dell' O&P

Metodica

- Semplice
- Strumentazione di base
- Pochi reagenti
- Facile esecuzione
- Costi contenuti

Risultati

- Rivela anche parassiti inattesi
- Rivela parassiti non patogeni
- Permette la diagnosi della maggior parte delle elmintiasi

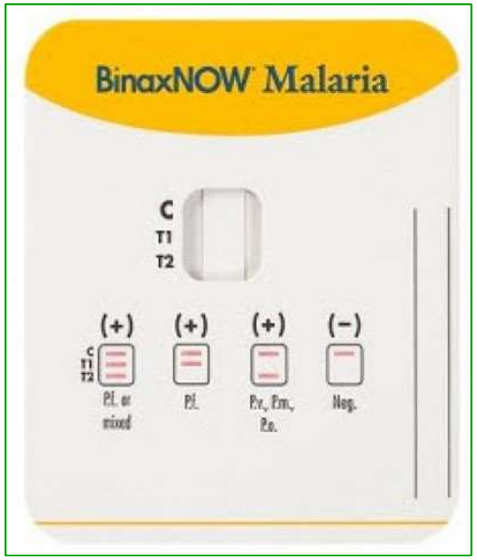
Limiti dell'O&P

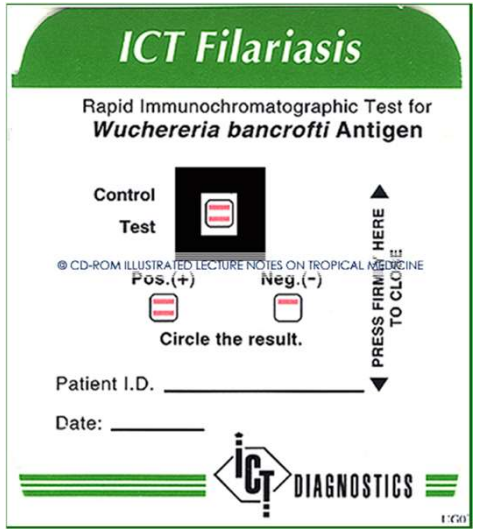
Microscopia	Personale
✓Labour-intensive ✓Time-consuming ✓Low sensitivity and specificity ✓Examination of multiple specimens (variation day to day) ✓Colorazioni specifiche ✓La morfologia non consente di discriminare tra forme patogene e non patogene	✓Microscopisti esperti (expertise in parasite morphology) ✓Training adeguato ✓Allenamento costante ✓Infezioni con bassa carica possono sfuggire ai microscopisti meno esperti

Rapid Diagnostic Test

- *E. histolytica*
- *G.intestinalis*
- *Cryptosporidium*

- ✓ *Plasmodi malarici*
- ✓ *Filarie*





Rapid Diagnostic Test (RDT)

VANTAGGI

- Facilità di esecuzione
- Non richiedono attrezzatura
- Risultati in tempi rapidi

LIMITI

- ✓ Commercializzazione limitata ad alcuni parassiti
- ✓ Reazioni crociate con RF
- ✓ Scarsa specificità (*P. ovale* e *P malariae*)
- ✓ Positività persistente a lungo dopo la terapia

Sierodiagnosi

- Infezioni protozoarie (*E. histolytica*, tripanosomi africani e americani, leishmania viscerale, toxoplasma, ecc)
- Infezioni da cestodi (cisticerchi, echinococco)
- Infezioni da trematodi (schistosomi, distomatosi epatiche da *Fasciola* e *Opisthorchis*)
- infezioni da nematodi (*Strongyloides, Trichinella, Toxocara*)

Sierodiagnosi

VANTAGGI

- Evita un prelievo invasivo
- Risultati rapidi
- Valutazione qualitativa (titolo Ab)

LIMITI

- Infezione in atto o pregressa?
- Titolo Ab persistente
- Reagenti poco standardizzati
- Falsi negativi (pazienti con deficit immunitari)
- Non disponibile per tutte le parassitosi

Nuove tecnologie

- NAAT(multiplex RT-PCr, LAMP)
- PANNELLI GASTROINTESTINALI

- ✓PROTEOMICA
- ✓POINT OF CARE TEST

Nucleic Acid Amplification Test

RT-PCR Monoplex

- *Giardia*
- *E. histolytica*
- *Cryptosporidium*
- *D. fragilis*

RT-PCR Multiplex

- *Giardia, Cryptosporidium, D. fragilis, E histolytica*
- Protozoi + elminti

Detection of selected intestinal helminths and protozoa at Hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex real-time PCR

Basuni, M.[1], Mohamed, Z.[2], Ahmad, M.[1], Zakaria, N.Z.[2] and Noordin, R.[1*]

Tropical Biomedicine 29(3): 434–442 (2012)

Table 1. Statistical comparison of positive samples detected by microscopy and real-time PCR method

Organism	Method	Positive samples detected	χ^2 statistic (df)	P-value
Helminths (N=225)	Microscopy	8	28.114 (1)	<0.001
	Real time PCR	46		
Protozoa (N=225)	Microscopy	4	46.833 (1)	<0.001
	Real time PCR	18		

Table 2. Details of each multiple infection of intestinal helminths and protozoa

Organisms detected in multiple infections	No. of samples
By microscopy	(N=2)
A. lumbricoides and *T. trichiura*	2
By multiplex real-time PCR	(N=9)
A. lumbricoides, *A. duodenale* and *N. americanus*	1
A. duodenale and *N. americanus*	1
A. duodenale and *S. stercoralis*	1
N. americanus and *S. stercoralis*	1
N. americanus and *G. lamblia*	4
A. lumbricoides and *E. histolytica*	1

Table 3. Detection of each species of helminths and protozoa by multiplex PCR and microscopy (n=225)

No.	Species of parasite	No of positives detected by multiplex real-time PCR (%)	No of positives detected by microscopy (%)
1.	*A. lumbricoides*	12 (5.3%)	7 (3.1%)
2.	*A. duodenale*	14 (6.2%)	0*
3.	*N. americanus*	20 (8.9%)	0*
4.	*S. stercoralis*	5 (2.2%)	0
5.	*T. trichiura*	Not available	3 (1.3%)
6.	*E. histolytica*	4 (1.8%)	2 (0.9%)
7.	*G. lamblia*	14 (6.2%)	2 (0.9%)
8.	*C. parvum*	0	0

* Microscopy is unable to differentiate hookworm ova of *A. duodenale* and *N. americanus*, zero is stated for both since no hookworm ovum was detected by microscopy

Real Time-PCR multiplex

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2011, p. 257–262 Vol. 49, No. 1
0095-1137/11/$12.00 doi:10.1128/JCM.01796-10
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Evaluation of Multiplex Tandem Real-Time PCR for Detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in Clinical Stool Samples[▽]

D. Stark,[1,2]* S. E. Al-Qassab,[2] J. L. N. Barratt,[1,2] K. Stanley,[3] T. Roberts,[1,2] D. Marriott,[1,2] J. Harkness,[1,2] and J. T. Ellis[2]

Division of Microbiology, SydPath, St. Vincent's Hospital, Sydney, Australia[1]; University of Technology Sydney, Department of Medical and Molecular Biosciences, Broadway, Australia[2]; and AusDiagnostics Pty. Ltd., 3/36 O'Riordan St., Alexandria, New South Wales, Australia[3]

TABLE 2. Summary of results

Method	No. of samples	No. of positive samples				Sensitivity (%)[a]	Specificity (%)[b]
		Cryptosporidium[c]	*D. fragilis*[d]	*E. histolytica*[e]	*Giardia*[f]		
MT-PCR	472	9	26	11	28	100	100
RT-PCR	472	9	26	11	28	100	100
Microscopy	472	5	10	23	14	38–56	97–100

[a] Calculated as follows: (number of true positives/[number of true positives + number of false negatives]) × 100.
[b] Calculated as follows: (number of true negatives/[number of true negatives + number of false positives]) × 100.
[c] Sensitivity, 56%; specificity, 100%.
[d] Sensitivity, 38%; specificity, 99%.
[e] Sensitivity, 47%; specificity, 97%.
[f] Sensitivity, 50%; specificity, 100%.

The Dual - Feces - Test (DFT)

a new, efficient combination of advanced microscopy and molecular tests for diagnosis of intestinal parasites

One day collection !

Tom van Gool, Aldert Bart, *Theo Mank, Michèle va

Section Clinical Parasitology, Dept. Medical Microbiol
*Regional laboratory, Kennermerland, Haarlem, ** Dept. Infecti

Dual-Feces-Test (DFT)
routine targets and handling

Simultaneous diagnosis of 32 infections (25 pathogens)

Improved sensitivity / ease of laboratory handling for 5 protozoal infections

	Pathogenic protozoa	Apathogenic protozoa	Helminths
PCR ✓	Entamoeba histolytica	Endolimax nana	Schistosoma haematobium
PCR ✓	Giardia lamblia	Entamoeba coli	Schistosoma mansoni
PCR ✓	Cryptosporidium	Entamoeba dispar	Schistosoma intercalatum
PCR ✓	Dientamoeba fragilis	Entamoeba hartmanni	Schistosoma japonicum
PCR ✓	Blastocystis species	Sarcocystis hominis	Fasciola hepatica
	Microsporidia	Iodamoeba butschlii	Clonorchis sinensis
	Cyclospora cayetanensis	Chilomastix mesnili	Opisthorchis spp.
	Isospora belli		Ascaris lumbricoides
	Entamoeba moshkovskii		Capillaria philippinensis
	Entamoeba chattoni		Enterobius vermicularis
			Mijnworm
			Strongyloides srecoralis
			Trichuris trichiura
			Diphyllobothrium latum
			Hymenolepis diminuta
			Hymenolepis nana
			Taenia spp.

microscopy (Ridley)

is PCR, when positive
n microscopy.

Advantages of the new Dual-Feces-Test (DFT)

- one day collecting system
- routine detection of all important intestinal parasites
- (very) high sensitivity for most important protozoa
- good clinical interpretation of test result (!)
- efficient laboratory handling: relative little technician-time needed for total package of diagnosis!

ESCMID Online Lecture Library © by author

Molecular Diagnostics and Parasitic Disease

Shawn Vasoo, MBBS, MRCP, Bobbi S. Pritt, MD*

KEYWORDS

• Malaria • PCR • *Trichomonas* • Leishmaniasis • Babesiosis • Trypanosomiasis • Amebiasis • NAAT

KEY POINTS

- Molecular tests play a growing role as adjuncts to traditional parasitology diagnostics, and in select situations, may replace traditional methods.
- Benefits of molecular methods may include increased sensitivity and specificity, but standardization of assays and paucity of commercial platforms are major limitations.
- Instrumentation and work flow requirements pose significant challenges for many parasite-endemic, resource-poor settings, although new applications of isothermal methods show significant promise for wider implementation.

Clin Lab Med 33 (2013) 461–503

Molecular Diagnostics and Parasitic Disease

Shawn Vasoo, MBBS, MRCP, Bobbi S. Pritt, MD*

Parassiti intestinali

Protozoi

- ➢ *Cryptosporidium spp*
- ➢ *Giardia intestinalis*
- ➢ *Entamoeba histolytica*
- ✓ *Dientamoeba fragilis*
- ❖ *Blastocistis spp*
- ○ *Cyclospora cayetaniensis*

Elminti

- ➢ *Hookworm*
- ➢ *Strongyloides stercoralis*
- ➢ *Trichuris trichiura*
- ✓ *Taenia spp (?)*
- ❖ *Altri ????*

Parassiti ematici e tissutali

- ➢ *Plasmodi malarici* (specie e sottospecie)
- ➢ *Babesia microti, B. duncani*
- ➢ *Trypanosoma cruzi*
- ➢ *Trypanosoma brucei gambiense, T. b. rhodesiense*
- ➢ *Wuchereria bancrofti*
- ➢ *Brugia malayi*
- ➢ *Loa loa*

- ✓ *Oncocerca volvulus*
- ✓ *Leishmania spp.*

Nucleic Acid Amplification Test

Vantaggi

- Sensibilità
- Specificità
- Velocità di diagnosi
- Svela coinfezioni
- Differenzia parassiti morfologicamente simili

Limiti

- ✓ Mancanza di standardizzazione:
  - nei metodi di estrazione
  - scelta target e primer
  - tecnica di amplificazione
- ✓ Pochi test approvati dall'FDA
- ✓ Reagenti e strumenti costosi
- ✓ Personale esperto

Pannelli Gastrointestinali
(Syndrome-based tests)

Luminex xTAG (Gastrointestinal Pathogen Panel, GPP)

12 patogeni virali e batterici, 3 parassiti (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *E. histolytica*)

NanoCHIP (Gastrointestinal Panel, GIP)

Giardia, *Cryptospridium*, *E. histolytica*, *E. dispar*, *D. fragilis*, *Blastocystis spp*

e 3 specie batteriche

Biofire FilmArray (Gastrointestinal Panel, GI)

14 specie batteriche, 5 virus e 4 parassiti (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *E. histolytica*, *Cyclospora*)

Trends Parasitol. july 2017

Pannelli Gastrointestinali
(Syndrome-based tests)

VANTAGGI

- Sensibilità
- Specificità
- Infezioni miste
- Automazione elevata
- Ridotta manualità
- TAT

LIMITI

- Costi elevati:
  - kit diagnostici
  - strumentazione

modificato Trends Parasitol july 2017

Tests tradizionali vs tests molecolari
Vantaggi

- Strumentazione di base
- Facile esecuzione
- Costi contenuti
- Permette la diagnosi della maggior parte delle elmintiasi

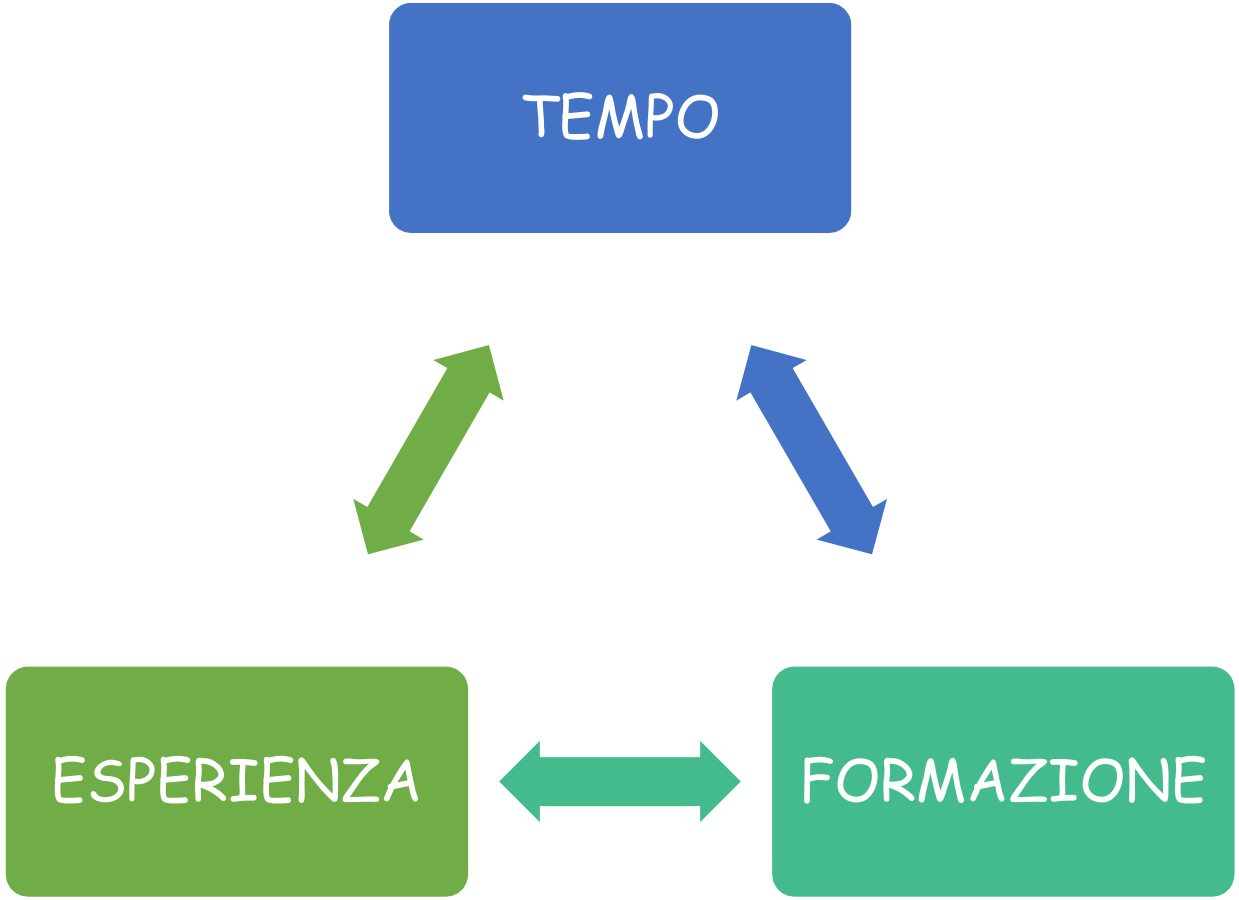
- ✓ Sensibilità
- ✓ Specificità
- ✓ Differenzia parassiti morfologicamente simili
- ✓ TAT

Test tradizionali vs test molecolari
Limiti

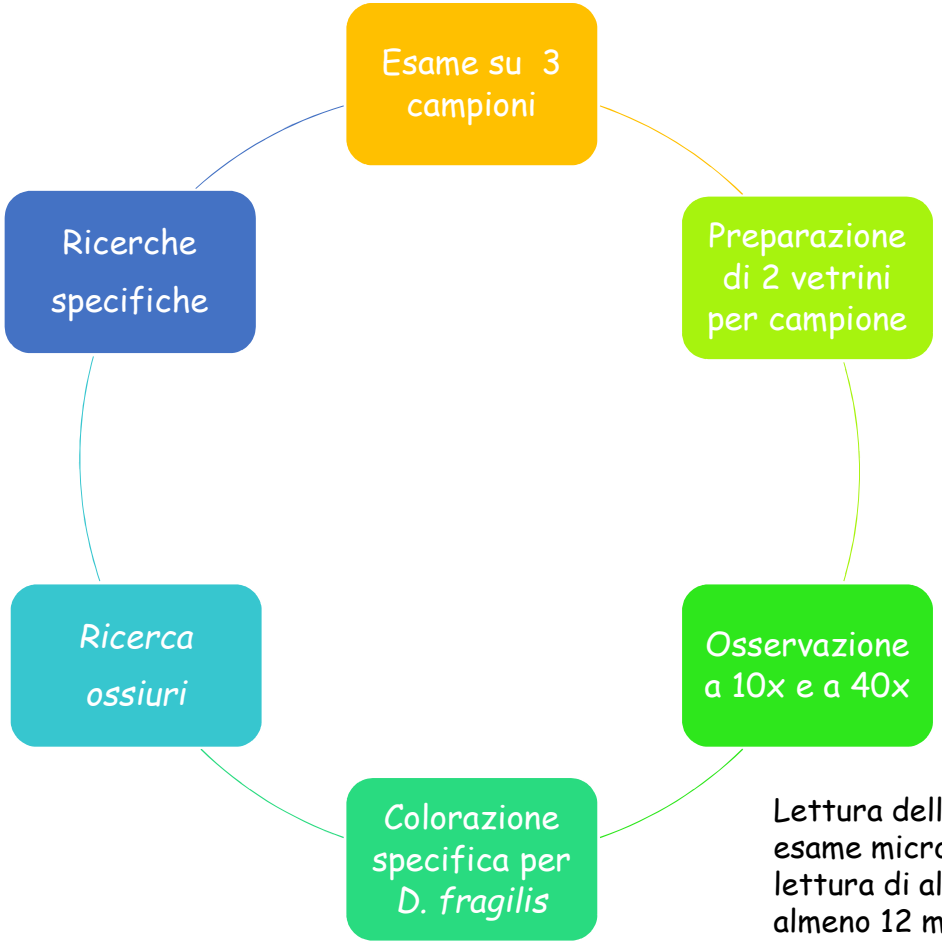
- Labor intensive
- Time consuming
- Personale esperto
- Bassa sensibilità
- Indagini su più campioni
- Specificità dipendente dall'expertise

- ✓ Estrazione
- ✓ Target
- ✓ Primer
- ✓ Amplificazione
- ✓ Rivelazione
- ✓ Contaminazione
- ✓ Strumenti e reagenti costosi
- ✓ Interpretazione risultati

Diagnosi tradizionale



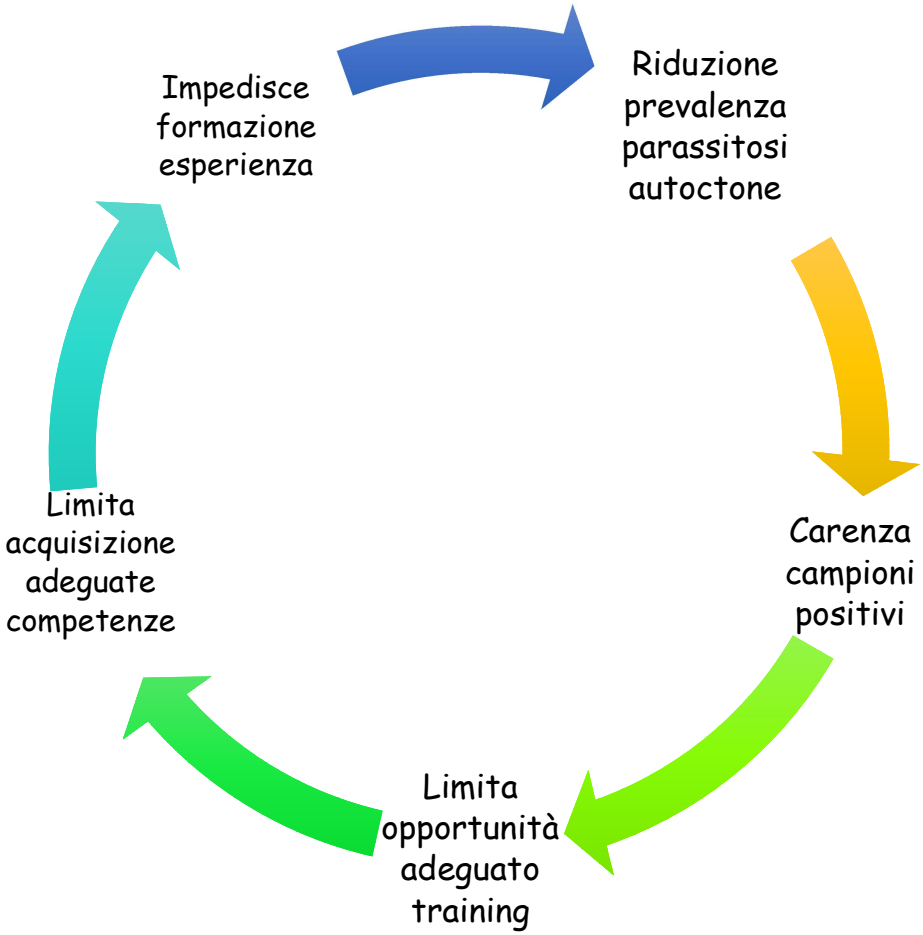
Tempo



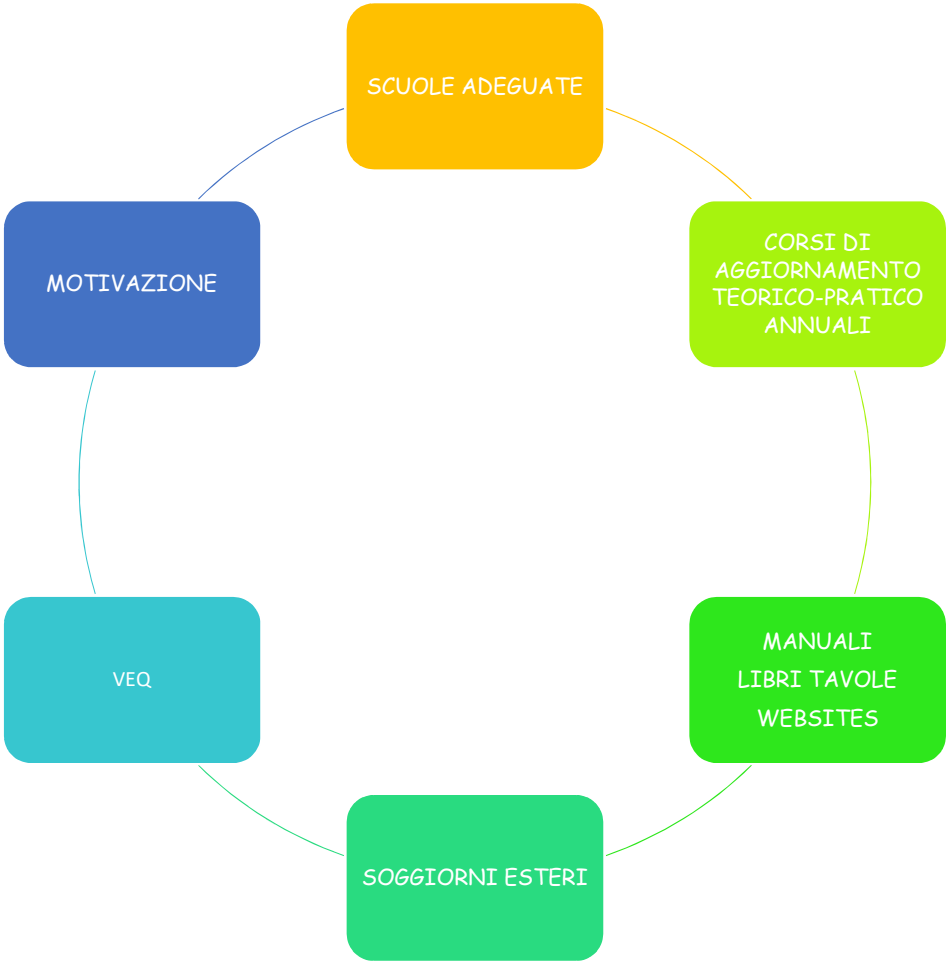
Esame microscopico dell'intero preparato; almeno 9 minuti di lettura per vetrino a 10X ed a 40X

Lettura delle colorazioni permanenti: esame microscopico dell'intero preparato; lettura di almeno 300 campi a 100X; almeno 12 minuti di lettura per vetrino

Esperienza


Riduzione prevalenza parassitosi autoctone
Carenza campioni positivi
Limita opportunità adeguato training
Limita acquisizione adeguate competenze
Impedisce formazione esperienza

FORMAZIONE


SCUOLE ADEGUATE
CORSI DI AGGIORNAMENTO TEORICO-PRATICO ANNUALI
MANUALI
LIBRI TAVOLE
WEBSITES
SOGGIORNI ESTERI
VEQ
MOTIVAZIONE

Opinion

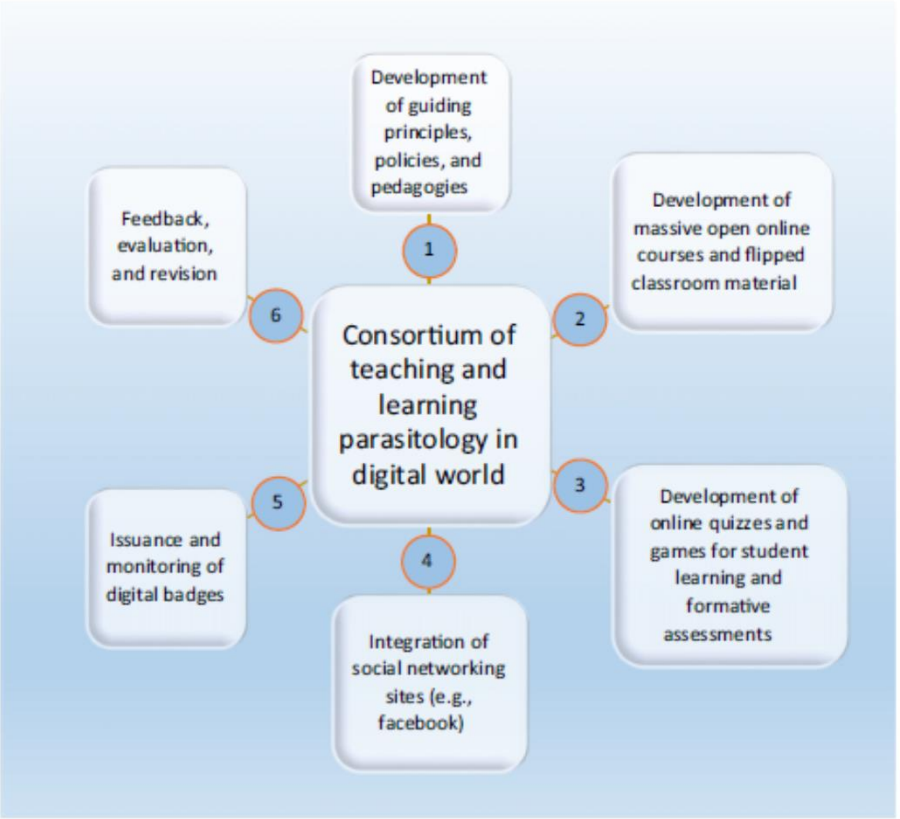
Can New Digital Technologies Support Parasitology Teaching and Learning?

Abdul Jabbar,[1,*] Robin B. Gasser,[1] and Jason Lodge[2]

Traditionally, parasitology courses have mostly been taught face-to-face on campus, but now digital technologies offer opportunities for teaching and learning. Here, we give a perspective on how new technologies might be used through student-centred teaching approaches. First, a snapshot of recent trends in the higher education is provided; then, a brief account is given of how digital technologies [e.g., massive open online courses (MOOCs), flipped classroom (FC), games, quizzes, dedicated Facebook, and digital badges] might promote parasitology teaching and learning in digital learning environments. In our opinion, some of these digital technologies might be useful for competency-based, self-regulated, learner-centred teaching and learning in an online or blended teaching environment.

Key Figure

Proposed Model for Parasitology Teaching and Learning in a 'Digital World' Under the Auspice of a Consortium of Experts



Trends in Parasitology

Figure 1. Numbers 1–6 represent key proposed activities of the consortium.

Risorse umane

Next-generation of parasitologists

Tradizionali	Innovativi	Emergenti
Microscopia ottica	RT-PCR multiplex	Next-generation sequencing (NGS)
Rapid Diagnostic Test	Pannelli gastrointestinali	MALDI-TOF MS
Sierologia		Point of Care

Emerging diagnostic test

frontiers in
CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY

OPINION ARTICLE
published: 06 March 2014
doi: 10.3389/fcimb.2014.00025

The diagnosis of infectious diseases by whole genome next generation sequencing: a new era is opening

Marc Lecuit [1,2,3,4] ***and Marc Eloit*** [5,6]*

[1] *Biology of Infection Unit, Institut Pasteur, Paris, France*
[2] *Inserm U1117, Paris, France*
[3] *Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris Descartes University, Paris, France*
[4] *Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Necker-Enfants Malades University Hospital, Paris, France*
[5] *Laboratory of Pathogen Discovery, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, France*
[6] *PathoQuest, Paris, France*
**Correspondence: marc.eloit@pasteur.fr*

Edited by:
Muriel Vayssier-Taussat, INRA, France

Reviewed by:
Remi N. Charrel, Aix Marseille Universite, France

Keywords: next-generation sequencing, infectious disease medicine, microbiology, diagnostic tests, routine, virology, bacteriology

MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects

NEELJA SINGHAL[1], MANISH KUMAR[2] *and* JUGSHARAN SINGH VIRDI[1]*

[1] *Department of Microbiology, University of Delhi South Campus, Benito Juarez Road, New Delhi-110021, India*
[2] *Department of Biophysics, University of Delhi South Campus, Benito Juarez Road, New Delhi-110021, India*

(*Received 15 January 2016; revised 1 June 2016; accepted 10 June 2016*)

SUMMARY

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is currently being used for rapid and reproducible identification of bacteria, viruses and fungi in clinical microbiological laboratories. However, some studies have also reported the use of MALDI-TOF MS for identification of parasites, like *Leishmania*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba*, ticks and fleas. The present review collates all the information available on the use of this technique for parasites, in an effort to assess its applicability and the constraints for identification/diagnosis of parasites and diseases caused by them. Though MALDI-TOF MS-based identification of parasites is currently done by reference laboratories only, in future, this promising technology might surely replace/augment molecular methods in clinical parasitology laboratories.

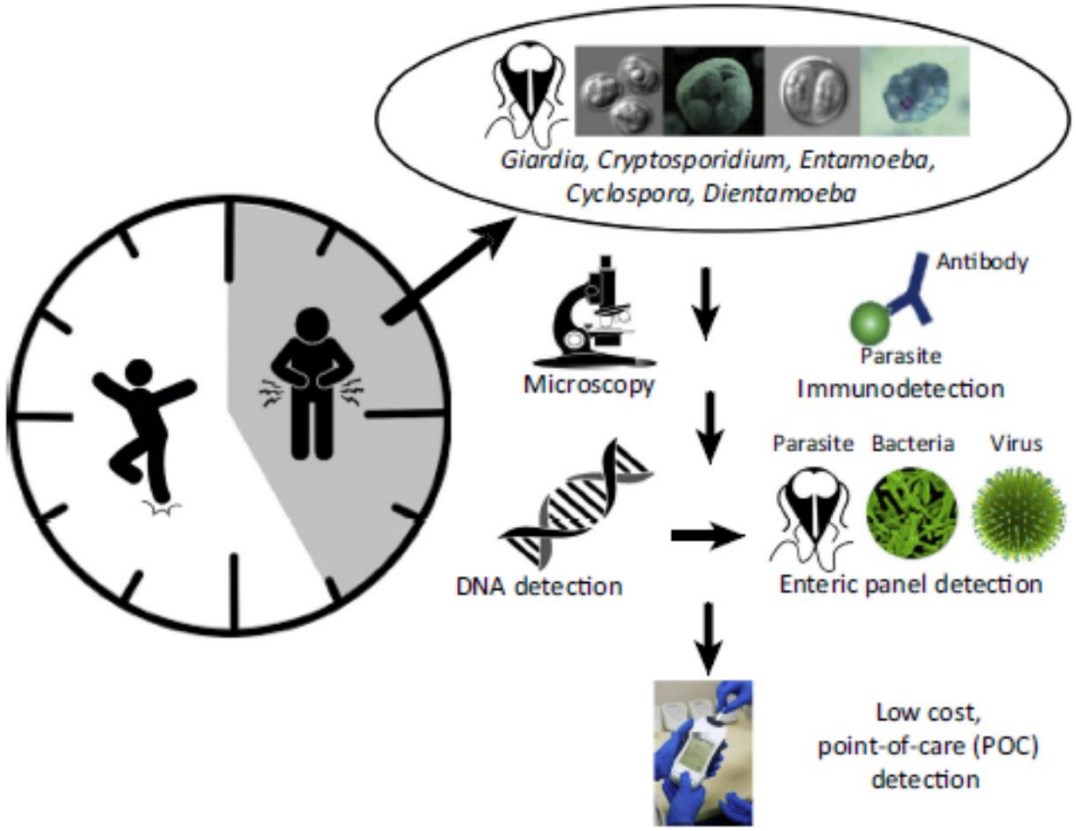
Parasitology, 2016

The ultimate goal:
Point-of-Care detection of enteric parasites

- Tecniche di amplificazione isotermica:
  - LAMP
  - Rolling circle amplification
  - Strand-displacement amplification (SDA)
  - Recombinase polymerase amplification (RPA)
- Biosensori
- Surface-Enanched Resonance Raman Scattering (SERRS)

Key Figure

Current and Emerging Detection Methods for Human Enteric Protozoan Parasites



Trends in Parasitology

Il percorso da seguire per evidenziare una parassitosi e identificare l'agente patogeno deve basarsi su due obbiettivi primari:

- Affidabilità del referto
- Costi contenuti

Anche di questo dobbiamo tener conto quando abbandoniamo/affianchiamo le metodiche tradizionali a favore delle nuove metodiche.

Cancrini e Iori, Parassitologia 46, 2004

La microscopia è insostituibile?/Intramontabile?

Parassitologia intestinale

- Per la diagnosi di parassiti che non sono inclusi nei pannelli multiplex
- Parassiti non patogeni

Parassitologia ematica

- ✓Parassitemia
- ✓Controllo della terapia
- ✓Stadiazione della tripanosomiasi africana
- ✓Filarie
- ✓Babesie

this day, a single assay that affords detection of the full range of the parasites that may be found via an ova and parasite microscopic examination has not been developed.

Garcia e al., Clin. Microbiol. Rev. 2018, 31:1

- La microscopia è una strategia diagnostica «di base» nel laboratorio di parassitologia

- L'osservazione microscopica non è risolutiva nel 100% dei casi, ma deve essere considerata un valido punto di partenza a cui affiancare le tecnologie innovative per svolgere ulteriori indagini

- Tutti dovremmo essere in grado di eseguirla al meglio producendo diagnosi affidabili in tempi brevi e a costi contenuti.

many of these inclusive panels are currently under development. Perhaps the most concerning challenge is the likely associated loss of microscopic morphological expertise when the majority of testing is converted from traditional to molecular assays.

Garcia e al., *Clin. Microbiol. Rev.* 2018, 31:1

La figura del parassitologo esperto non deve sparire, anzi sarà ancor necessaria per dirimere i casi con esiti discordanti e per la ricerca di parassiti che necessitano di una diagnosi tradizionale

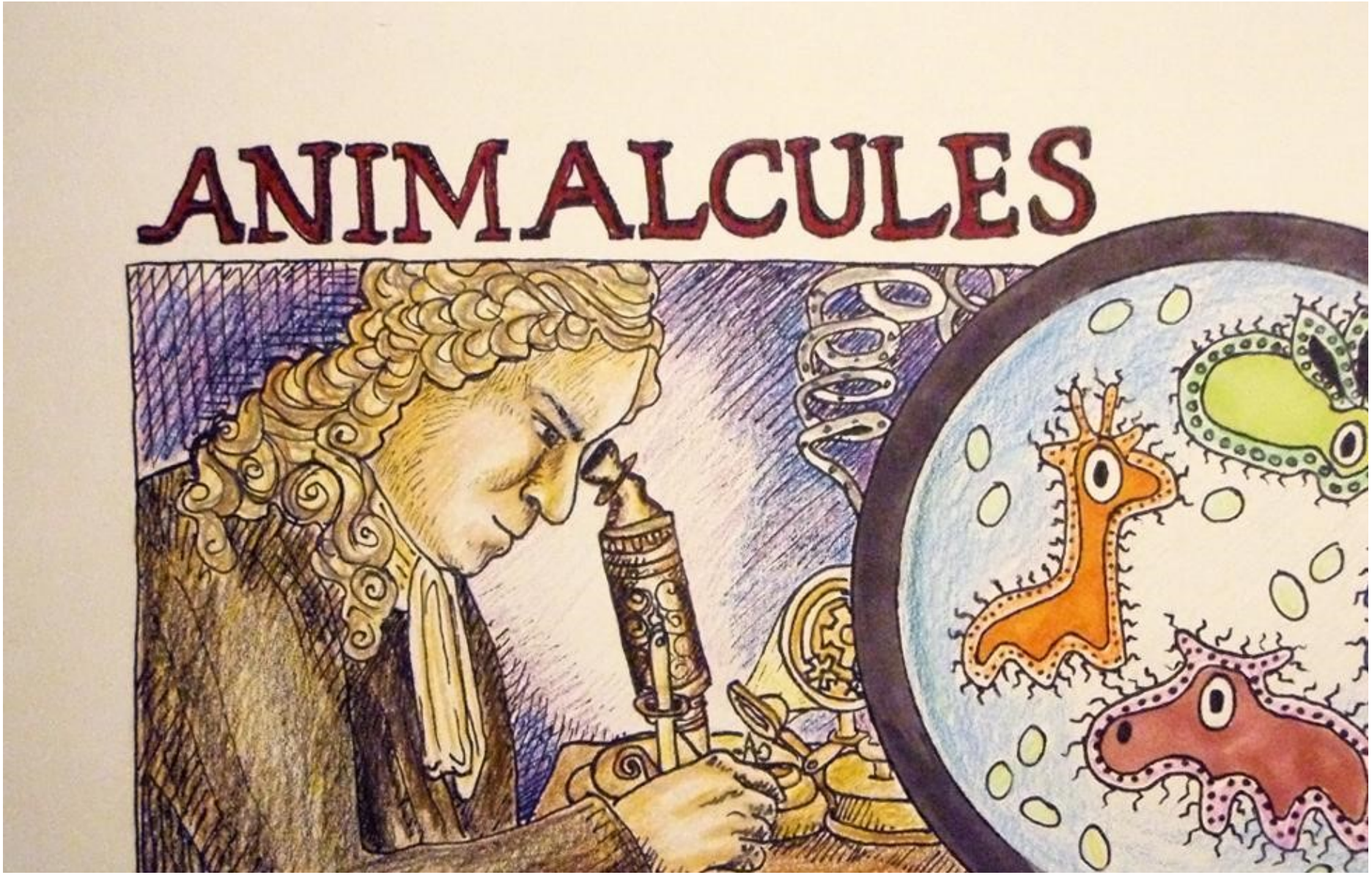
Messaggio per i futuri parassitologi

Acquisizione di conoscenze teoriche
pratiche

AGGIORNAMENTO

Allenamento costante al microscopio

Utilizzo adeguato delle nuove tecnologie



GRAZIE