Le nuove tecniche migliorano sensibilità e specificità: un solo campione per le parassitosi intestinali è sufficiente?

Corso Precongressuale A

SOSTENIBILITÀ, FATTIBILITÀ E STRATEGIE DA ADOTTARE NELLA DIAGNOSTICA PARASSITOLOGICA

Dott.ssa Valeria Besutti

AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITA' PADOVA

THE AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE
Vol. 24, No. 2
Printed in U.S.A.
Copyright © 1975 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

NUMBERS OF *GIARDIA* IN THE FECES OF INFECTED CHILDREN*

MICHAEL DANCIGER† AND MANUEL LOPEZ‡
International Center for Medical Research, Tulane University Medical Center, New Orleans, Louisiana 70112

La **microscopia** è il metodo classico per la diagnostica parassitologica, a volte l'unico test utilizzato

Presenta, però, alcuni limiti:

- procedure che richiedono tempo
- difficoltà di differenziare alcune specie
- dipendenza da competenza e abilità del microscopista

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 1999, p. 2408–2411
Vol. 37, No. 8
0095-1137/99/$04.00+0
Copyright © 1999, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Utility of Multiple-Stool-Specimen Ova and Parasite Examinations in a High-Prevalence Setting

CHARLES P. CARTWRIGHT[1,2]*
Department of Laboratory Medicine and Pathology, Hennepin County Medical Center, Minneapolis, Minnesota 55415,[1] and Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, Minnesota 55455[2]

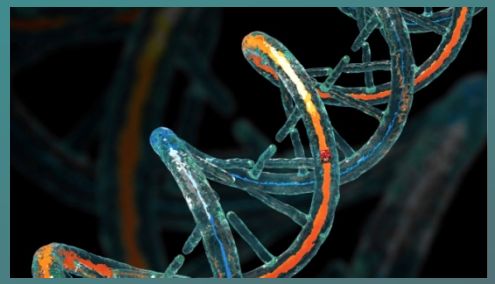
Received 2 December 1998/Returned for modification 8 April 1999/Accepted 21 April 1999

Poiché i parassiti fecali vengono emessi a intermittenza, viene raccomandata la raccolta di **tre campioni**

ELSEVIER

International Journal of Medical Microbiology
Volume 296, Issue 6, 12 October 2006, Pages 397-403

Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba* and *Entamoeba dispar* in carriers: Performance and implications in a non-endemic setting



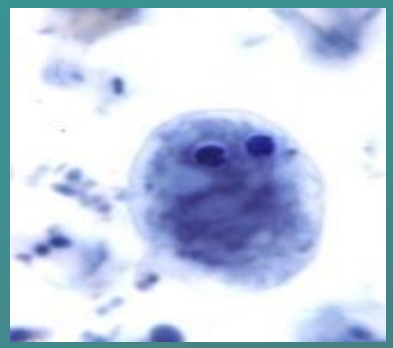
Per migliorare la diagnosi di infezioni da parassiti enterici, intorno al 2006, è stata introdotta la **biologia molecolare**

La metodica di Real Time PCR, utilizzata in molti laboratori, permette di aumentare la sensibilità e la specificità nell'identificazione del parassita

La Multiplex Real Time PCR, una metodica che utilizza multipli set di primers in una singola mix, è in grado di identificare simultaneamente più target in una sola reazione

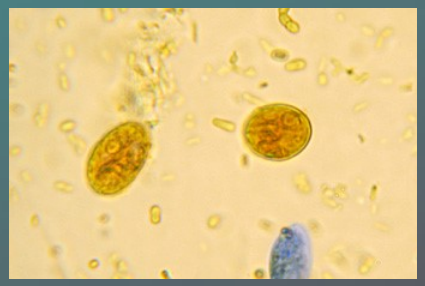
Possono essere acquisite più informazioni in una singola corsa, risparmiando tempo e reagenti

Dientamoeba fragilis: difficile individuarla a fresco e con liquidi fissativi privi di formalina

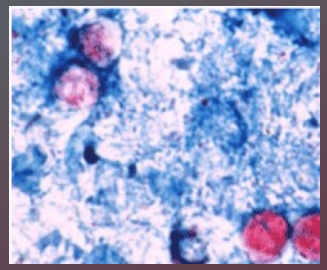


Entamoeba histolytica: elevata patogenicità e impossibilità nell'identificazione microscopica di specie

QUALI TARGET PER TECNICHE MOLECOLARI?



Giardia duodenalis: le linee guida prevedono la raccolta di almeno 5/6 campioni



Cryptosporidium spp. e ***Cyclospora cayetanensis***: raccomandata colorazione Ziehl Neelsen e la valutazione da parte di microscopista esperto

Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy

L. E. S. Bruijnesteijn van Coppenraet[1], J. A. Wallinga[1], G. J. H. M. Ruijs[1], M. J. Bruins[1] and J. J. Verweij[2]

1) *Laboratory of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Isala Clinics, Zwolle and* 2) *Department of Parasitology, Centre of Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands*

L'analisi molecolare dei protozoi gastrointestinali è più sensibile e più specifica della microscopia ma, ad oggi, non ha ancora sostituito l'analisi microscopica

Target	Microscopy$^+$/ PCR$^+$	Microscopy$^+$/ PCR$^-$	Microscopy$^-$/ PCR$^+$	Microscopy$^-$/ PCR$^-$
Entamoeba histolytica	1	–	–	396
Giardia lamblia	28	1[a]	16	352
Cryptosporidium parvum/hominis	2	–	1	394
Dientamoeba fragilis	64	5	58	270

Microscopic re-examinations of discrepant samples are not included. Results of repeated paraPCR of initially inhibited samples are included. The protozoa in mixed infections are presented as separate detections.

[a]One PCR inhibited sample was positive for *G. lamblia* by microscopy and is included in the Microscopy$^+$/PCR$^-$ results for *G. lamblia*.

Molecular Biology Can Change the Classic Laboratory Approach for Intestinal Protozoan Infections

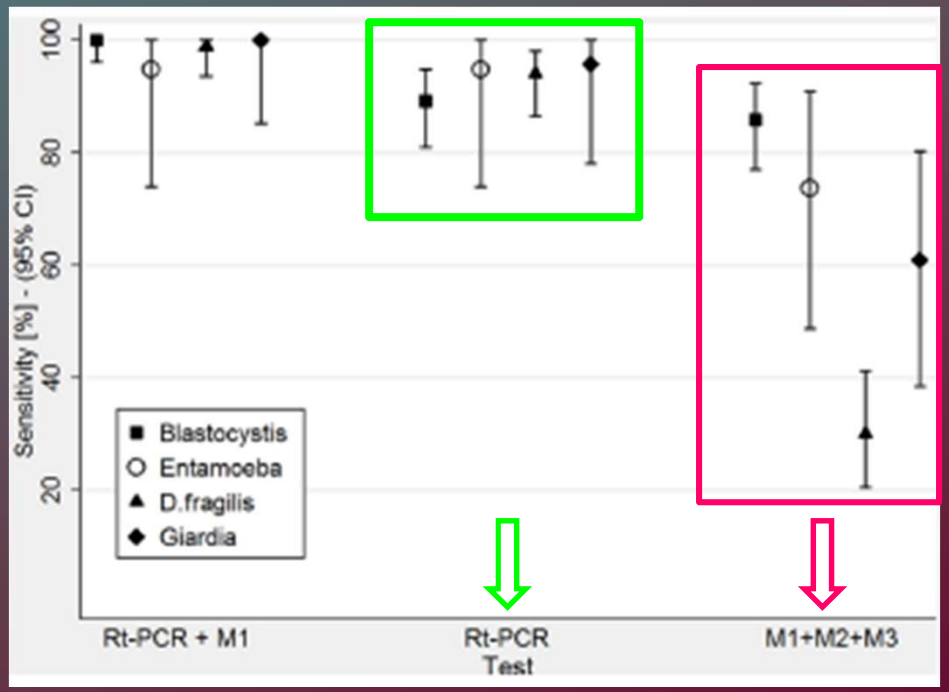
Fabio Formenti[1], Matteo Valerio[2], Massimo Guerriero[1,3], Francesca Perandin[1], Barbara Pajola[1], Manuela Mistretta[1], Stefano Tais[1], Monica Degani[1] and Zeno Bisoffi[1]*

[1] Centre for Tropical Diseases, Sacro Cuore Don Calabria Hospital, Verona, Italy, [2] Medical Oncology, Sacro Cuore Don Calabria Hospital, Verona, Italy, [3] Department of Computer Science, University of Verona, Verona, Italy

La diagnostica molecolare (Real Time PCR) permette l'analisi di un singolo campione fecale

È stato dimostrato come la sensibilità rimanga alta rispetto alla classica analisi dei tre campioni fecali tramite microscopia

La Real Time PCR ha una elevata sensibilità, per alcuni protozoi superiore rispetto alla sola analisi microscopica dei tre campioni fecali



Real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples

Jaco J. Verweij[a,*], Bert Mulder[b], Bregje Poell[b], Dorien van Middelkoop[b], Eric A.T. Brienen[a], Lisette van Lieshout[a]

[a]*Leiden University Medical Center, Department of Parasitology, Postbus 9600, 2300 RC Leiden, The Netherlands*
[b]*Laboratory of Medical Microbiology Twente Achterhoek, Postbus 377, 7500 AJ Enschede, The Netherlands*

Verwej et al. hanno eseguito nel 2007 il Tri Fecal Test (TFT) su due campioni conservati in SAF (microscopia) ed uno fresco (Real Time PCR)

RT-PCR 30 campioni positivi x 2 microscopia → 28 + (Ct medio 27,5) e 2 inibiti

RT-PCR 25 campioni positivi x 1 microscopia → 21 + (Ct medio 30,4)

RT-PCR 30 campioni negativi x 2 microscopia → 29 – e 1 + (+ anche vetrino)

La minima differenza in Ct (3) tra i test su singolo e doppio campione dimostra che il test su singolo campione è possibile, mantenendo una buona sensibilità e specificità

Dientamoeba fragilis
microscopia vs molecolare su tre campioni

"Fixatives/preservatives that are not recommended for molecular detection include formalin, SAF, LV-PVA, and Protofix"

Stool Specimens - Molecular Diagnosis

I campioni sono raccolti in fissativo, consegnati al laboratorio e concentrati secondo Ritchie. Il pellet è quindi centrifugato a 13.200 rpm per eliminare il fissativo e preparato per la lisi

MagNA Pure 96 Instrument

ViiA7 Real-Time PCR System

Dientamoeba fragilis
microscopia vs molecolare su tre campioni

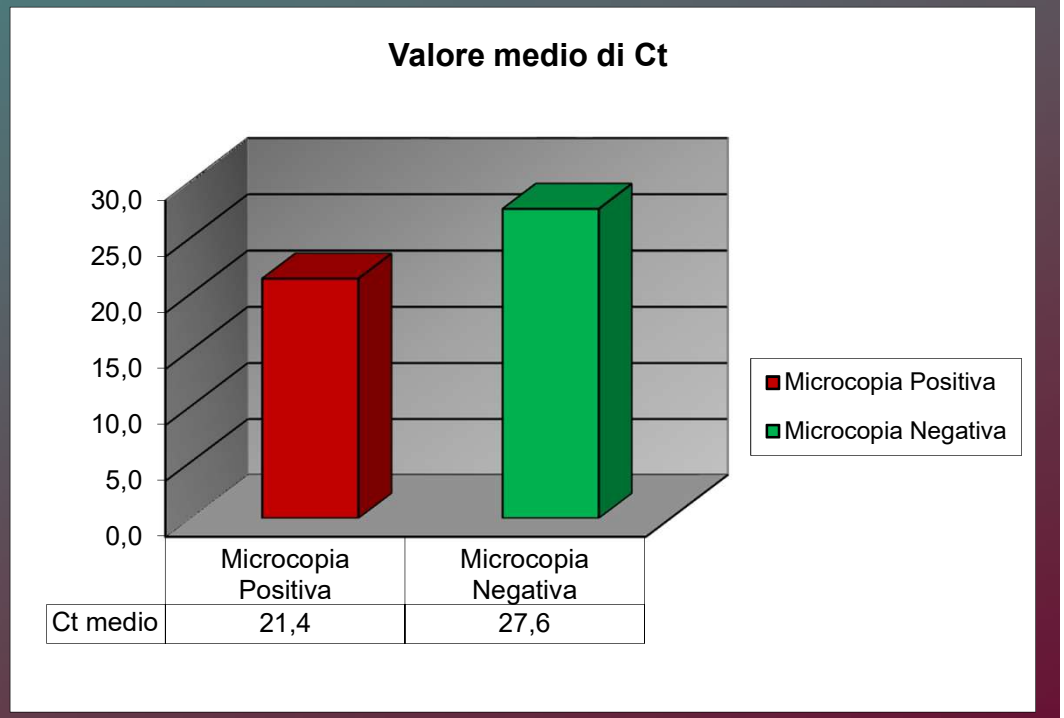
	Campioni	Microscopia	RT PCR		Campioni	Microscopia	RT PCR		Campioni	Microscopia	RT PCR
1	C1	+	24	9	C1	+	24,2	17	C1	-	26,1
	C2	-	31,4		C2	-	28,3		C2	-	35,5
	C3	-	32,6		C3	+	27,4		C3	+	23,7
2	C1	-	23,9	10	C1	-	20,4	18	C1	-	35,8
	C2	+	22,1		C2	-	21,9		C2	-	27
	C3	-	23,4		C3	+	21,5		C3	+	20,7
3	C1	+	23,5	11	C1	+	25,3	19	C1	-	30,6
	C2	+	22,4		C2	-	27,5		C2	-	31,3
	C3	-	27,5		C3	-	27,6		C3	+	21
4	C1	-	24,8	12	C1	-	31,2	20	C1	+	21,8
	C2	-	27,2		C2	+	24,4		C2	-	29,3
	C3	+	18,9		C3	-	29,2		C3	-	31,8
5	C1	+	20,3	13	C1	-	23,7	21	C1	-	35,8
	C2	-	25,5		C2	+	18,4		C2	-	23,2
	C3	-	38,5		C3	-	29,2		C3	+	20,7
6	C1	-	29,6	14	C1	+	23,1	22	C1	-	28,9
	C2	-	25,5		C2	+	19,3		C2	-	29,3
	C3	+	19,7		C3	-	32,9		C3	+	23,4
7	C1	-	36,9	15	C1	-	26,6	23	C1	-	22,8
	C2	-	25,3		C2	-	25,1		C2	+	24,9
	C3	+	20,2		C3	+	23,6		C3	-	24,2
8	C1	-	28,5	16	C1	-	24,9				
	C2	-	29,2		C2	+	22,7				
	C3	+	20,2		C3	-	24,2				

Dientamoeba fragilis
microscopia vs molecolare su tre campioni

23 serie di campioni (per ogni serie, 3 campioni conservati in Para-Pak® ULTRA SAF e concentrati secondo Ritchie)

I campioni sono analizzati separatamente sia al microscopio, sia in Real Time PCR

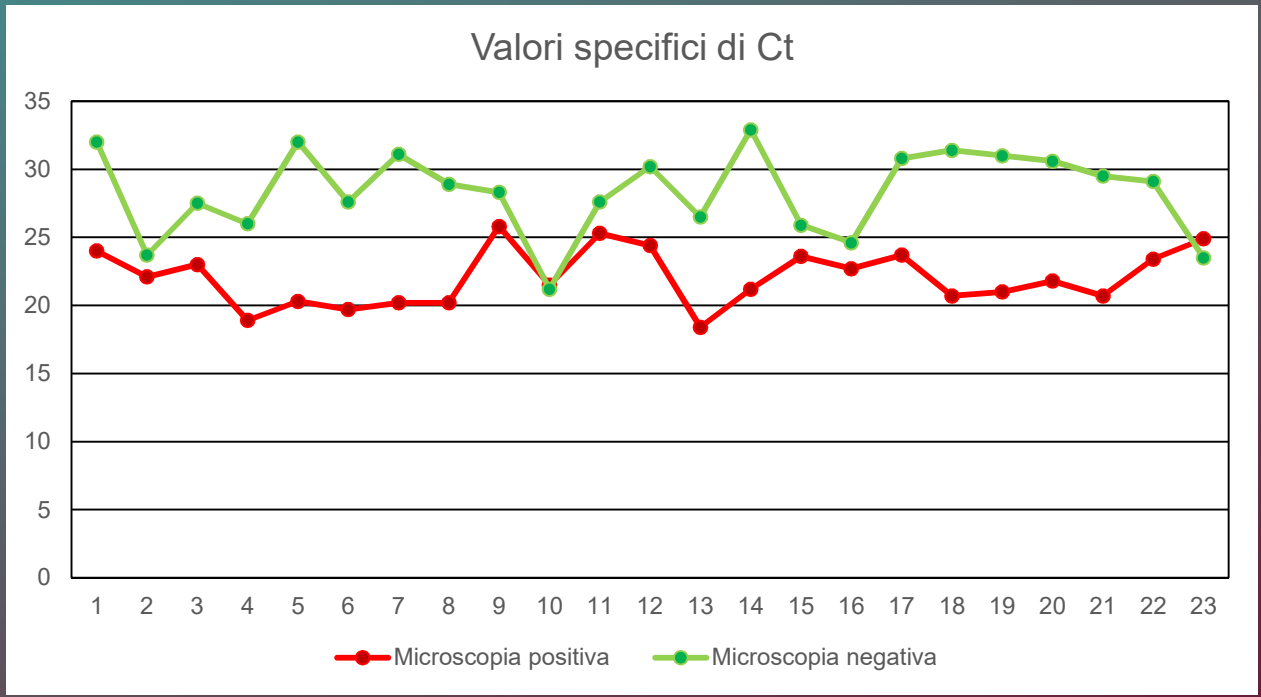
- i <u>campioni positivi</u> alla microscopia mostrano valori di Ct più bassi (**media 21,4**)
- i <u>campioni negativi</u> alla microscopia mostrano valori di Ct più alti (**media 27,6**)



Dientamoeba fragilis
microscopia vs molecolare su tre campioni

I campioni risultati negati alla microscopia sono positivi in Real Time PCR

La tecnica di Real Time PCR, più sensibile e specifica rispetto alla microscopia, permette di ridurre il numero di campioni fecali da analizzare (da 3 a 1)



Indagine policentrica per testare il kit AusDiagnostics distribuito da Nuclear Laser

	Campioni consegnati	Campioni analizzati
BERGAMO ASST Papa Giovanni XXIII	40	15
BOLOGNA Azienda Universitaria Sant'Orsola - Malpighi	20	6
BOLZANO Ospedale di Bolzano	49	21
CASTENEDOLO Synlab Italia	28	10
COMO ASST Lariana Presidio Ospedaliero Sant'Anna	10	5
DESIO Ospedale di Desio	7	3
LEGNANO ASST Ovest Milanese	15	9
LUCCA Ospedale San Luca	11	5
MATERA Ospedale Madonna delle Grazie	4	4
MODENA Ospedale Sant'Agostino Estense	20	10
NAPOLI Azienda Ospedaliera dei Colli	26	11
NAPOLI Azienda Universitaria Federico II	2	2
PADOVA Azienda Ospedaliera	9	9
PAVIA IRCCS Policlinico San Matteo	23	12
PRATO Nuovo Ospedale Santo Stefano	15	7
ROMA Ospedale Pediatrico Bambino Gesù	22	8
TORINO Città della Salute e della Scienza	4	3
VOGHERA ASST Pavia	4	4
TOTALE	**309**	**144**

Indagine policentrica per testare il kit AusDiagnostics distribuito da Nuclear Laser

18 centri partecipanti

309 campioni consegnati

144 campioni analizzati

Target RT PCR Padova

Dientamoeba fragilis

Entamoeba histolytica

Entamoeba dispar

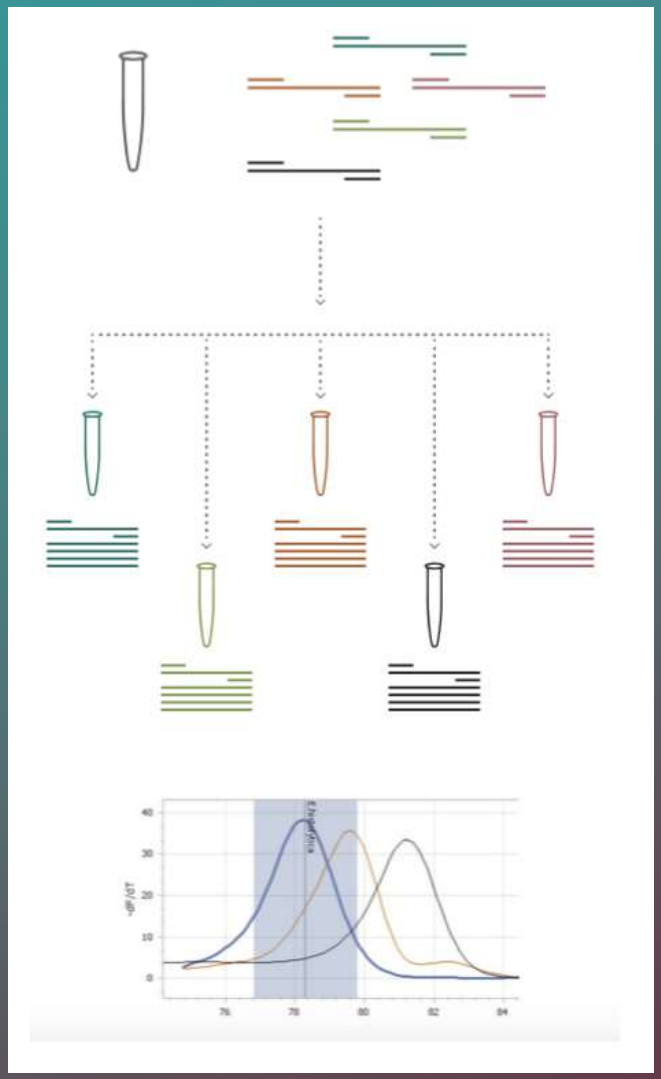
Giardia lamblia

Cryptosporidium spp

HP - Parassiti - Cod. AU25021

#	Target	Descrizione
1	Giardia	Giardia 18S
2	Giardian	Giardia lamblia
3	Cryptosporidium	Cryptosporidium (parvum e hominis)
4	D. fragilis	Dientamoeba fragilis
5	E. histolytica	Entamoeba histolytica (no dispar)
6	Blastocystis 1 e 3	B.hominis tipo 1 e tipo 3
7	Cyclospora	Cyclospora cayetanensis
8	SPIKE	Controllo di inibizione di PCR

Indagine policentrica per testare il kit AusDiagnostics distribuito da Nuclear Laser



Retrotrascrizione e pre amplificazione in multiplex
(15/19 cicli)

Real Time PCR
Eseguita in singoli pozzetti separati, senza competizione tra primers
Amplificazione con primer nested: elevata specificità e sensibilità

Analisi dei dati
Visualizzazione automatica dei risultati (curve di melting)
Possibilità di interfacciamento con il sistema informatico

Indagine policentrica per testare il kit AusDiagnostics distribuito da Nuclear Laser

HIGH-PLEX System

MT- Analyser 384-well
CU9059

Indagine policentrica per testare il kit AusDiagnostics distribuito da Nuclear Laser

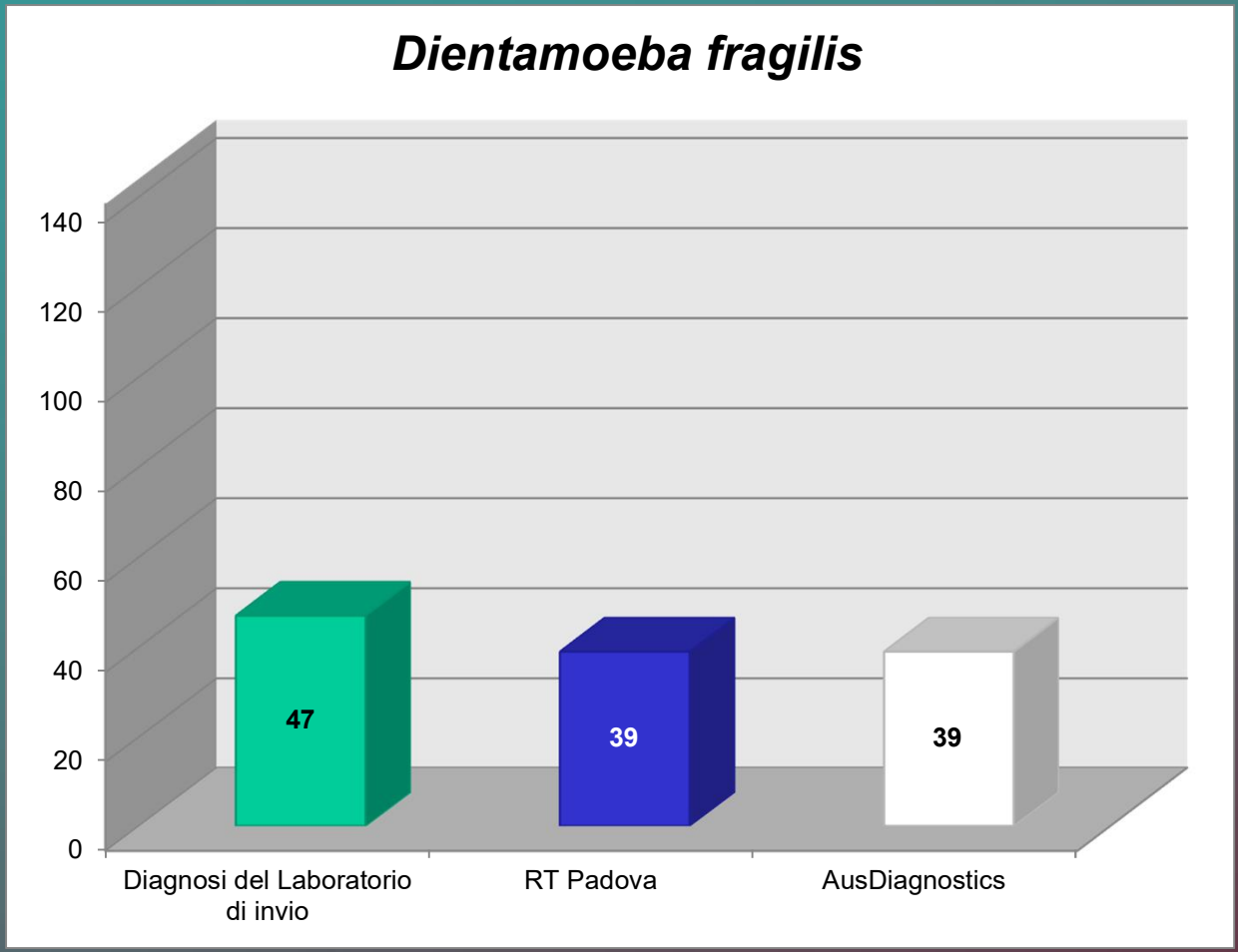
Metodo di raccolta del campione

Fresco	**63%**
Conservato	**37%**

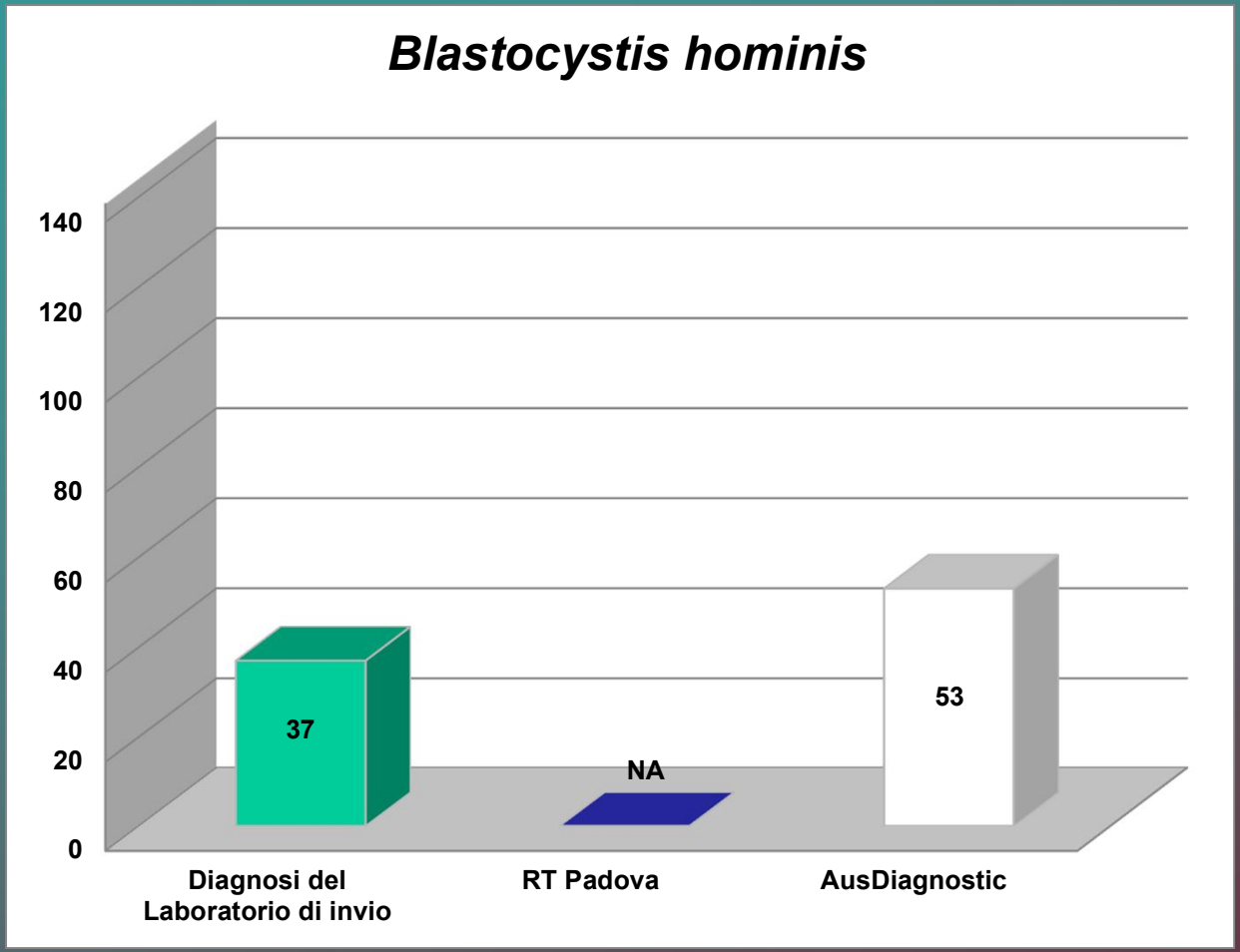
(Para-Pak ULTRA SAF, Para-Pak ULTRA SVT, Para-Pak EcoFix, Cary-Blair)

Principali tecniche utilizzate

Microscopia dopo arricchimento	**69,90%**
Colorazione estemporanea	**26,50%**
(Lugol, Dobell, Kinyoun)	
Colorazione permanente	**26,20%**
(Giemsa, Ziehl Neelsen modificata, Tricromica)	
Esame colturale per amebe	**3,50%**
Esame sierologico per *E. histolytica*	**6,40%**
Ricerca di acidi nucleici	**37,80%**
(Seegene, Viasure, Microarray, Filmarray)	



Di 144 campioni testati:
47 segnalati di cui 32 confermati in entrambi i sistemi
7 non segnalati, ma positivi in entrambi i sistemi

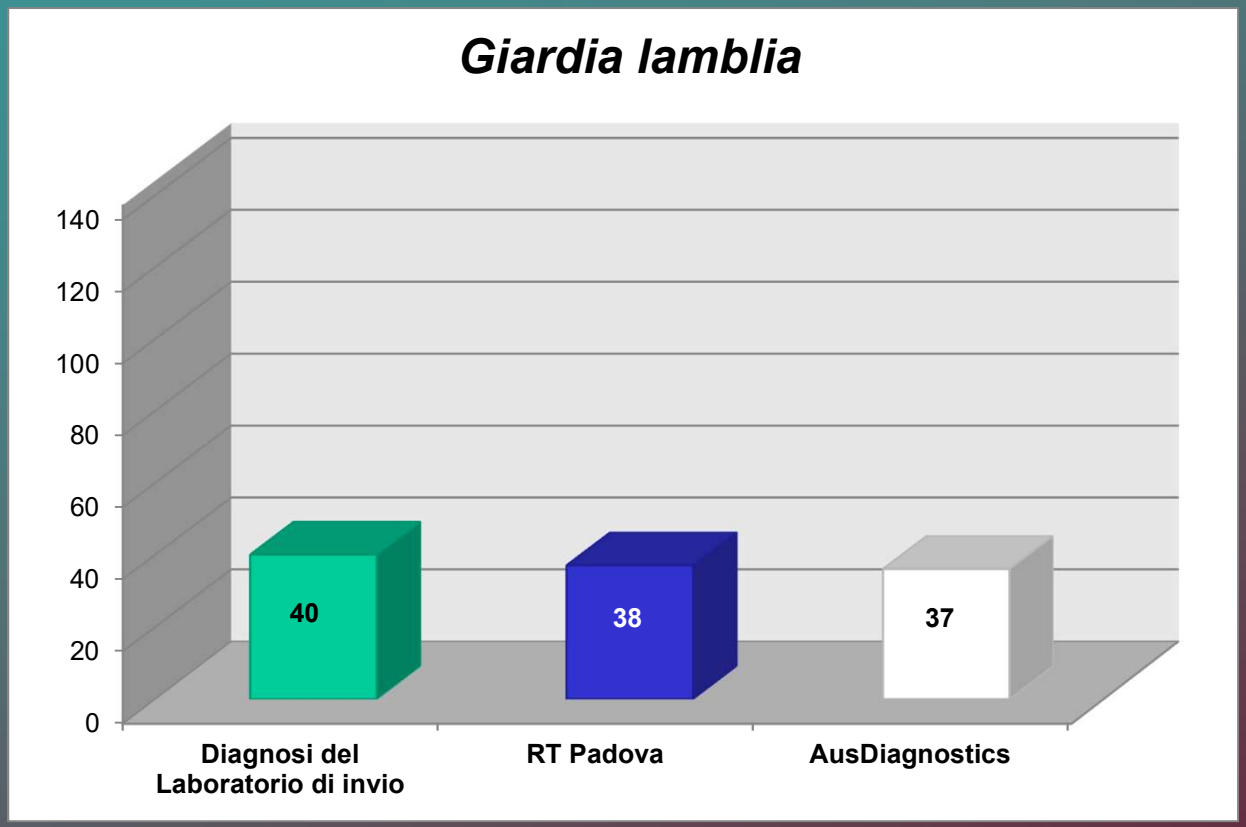


Di 144 campioni testati:

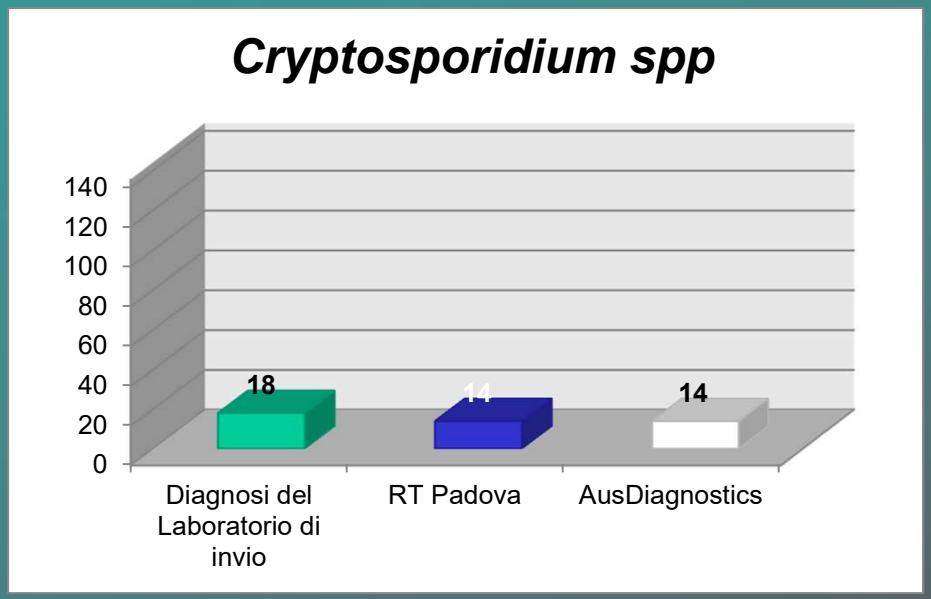
37 segnalati, ma 53 positivi con AusDiagnostics

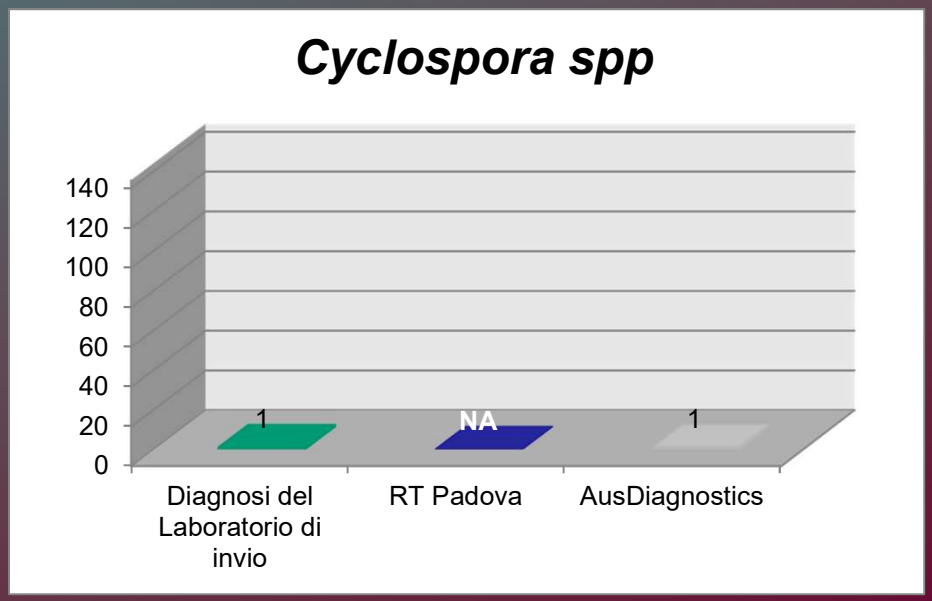
- non visti alla microscopia?
- non segnalati dal laboratorio?
- sovrastima del sistema molecolare?

Di 144 campioni testati:
40 segnalati di cui 35 confermati in entrambi i sistemi e 1 confermato solo in house
2 non segnalati, ma positivi in entrambi i sistemi

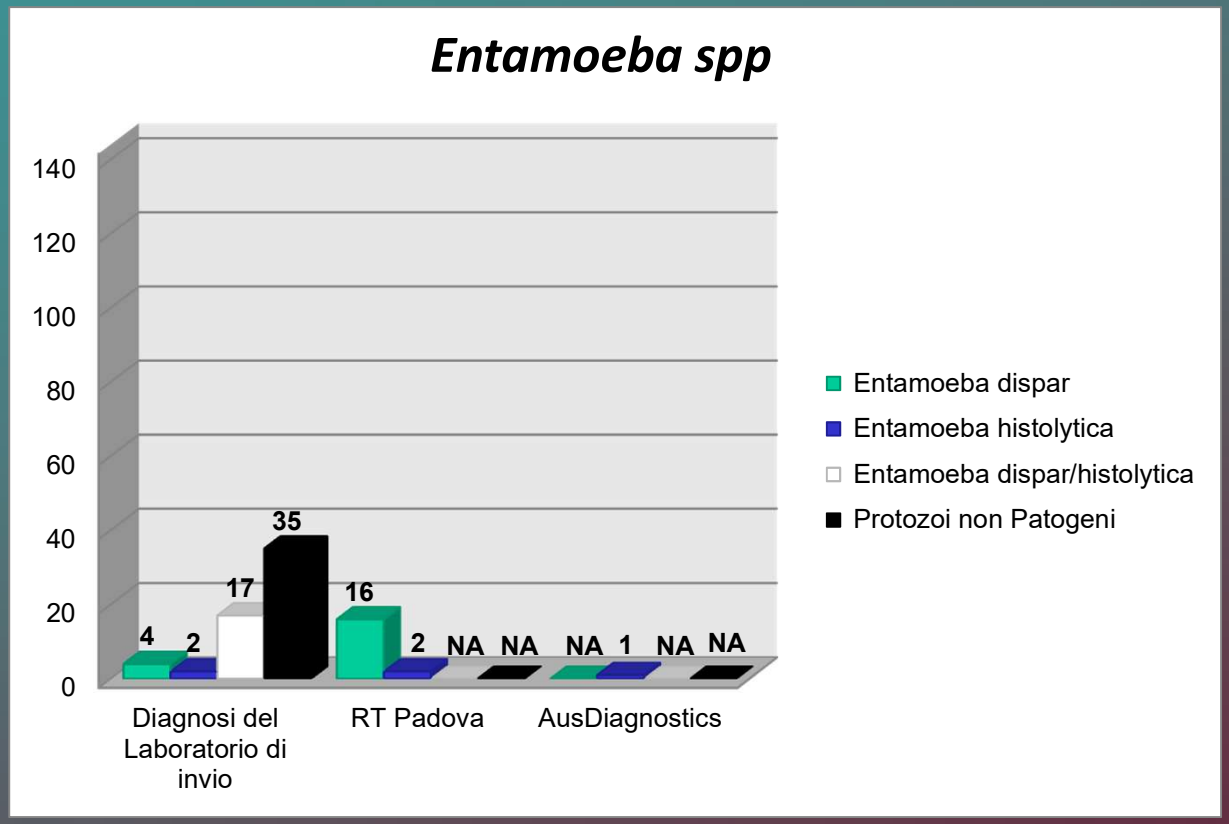


Di 144 campioni testati:
18 segnalati di cui 14 confermati in entrambi i sistemi





Di 144 campioni testati:
4 segnalati come *E. dispar* di cui 2 confermati in house
2 segnalati come *E. histolytica* non confermati
17 segnalati come *E. histolytica/dispar* di cui 1 identificato come *E. histolytica* in entrambi i sistemi e 1 solo in house

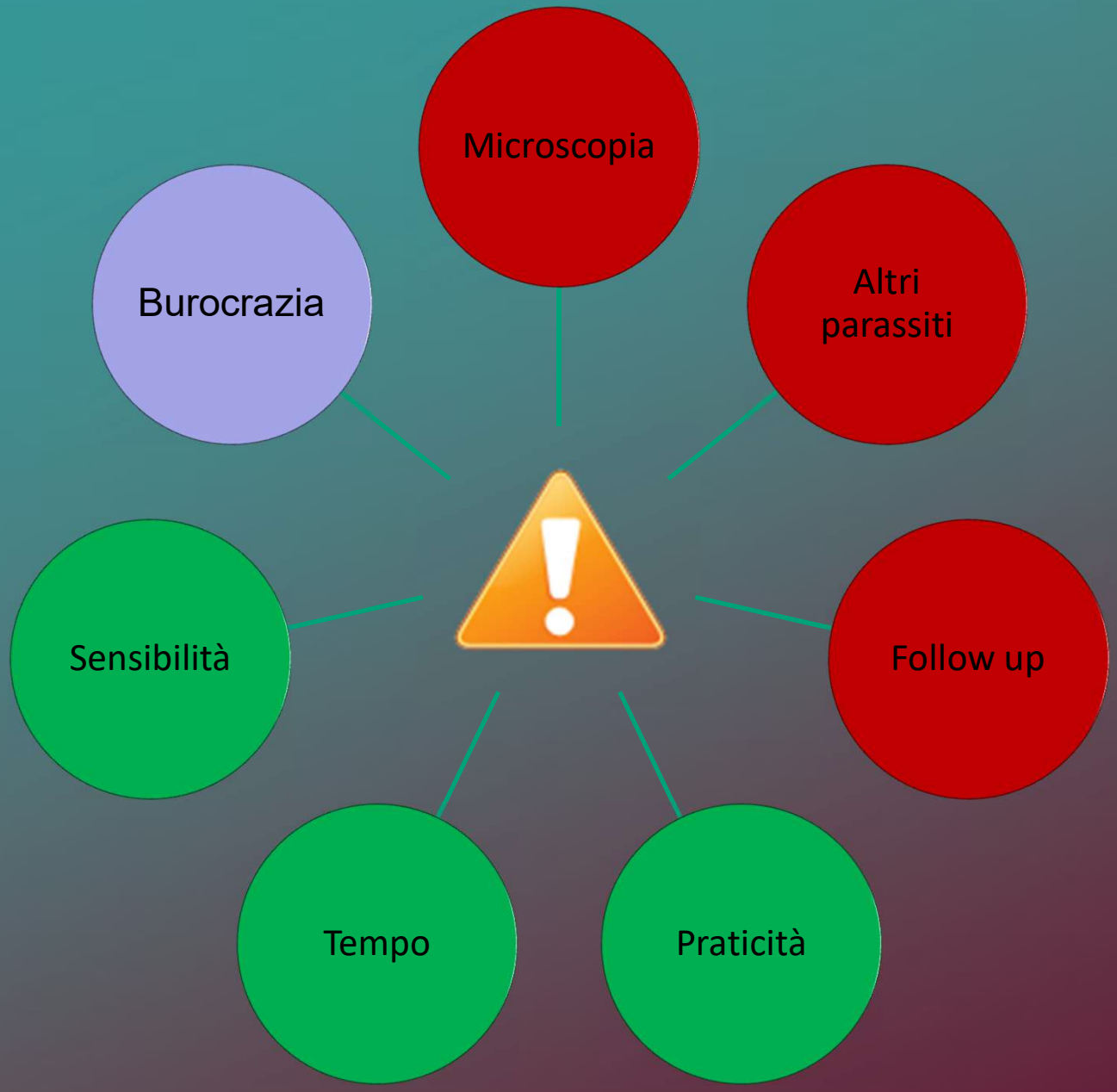


16 campioni positivi per *E. dispar* in house :
2 segnalati come *E. dispar*
14 segnalati come *Entamoeba spp* o Protozoo non patogeno

Conclusioni

Il lavoro eseguito su *D. fragilis* con metodo in house evidenzia che è possibile fare diagnosi su un solo campione. Nonostante la RT-PCR perda in Ct passando a singolo campione, resta comunque più sensibile della microscopia su 3 campioni

Anche l'indagine policentrica dimostra che il metodo molecolare applicato a singolo campione può sostituire la microscopia su 3 campioni, solo per i target considerati

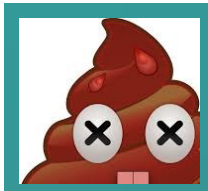

Microscopia
Burocrazia
Altri parassiti
Sensibilità
Follow up
Tempo
Praticità

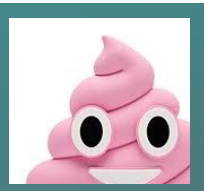
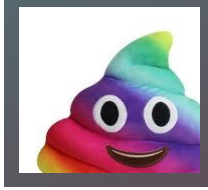
RINGRAZIAMENTI

Il mio gruppo di lavoro
Biasolo M.A., Porcellato S., Saluzzo F., Menini M.

I partecipanti della Policentrica
Raglio A., Varani S., Frizzera E., Langgartner M., Pagani E., Manzin A., Martinelli E., Valli M., Sarto C., Cavallari S., Clerici P., Vettori C., Colonna C., Gargiulo R., Coppola M.G., Salvatore P., Bruno A., Maserati R., Brunelli T., Putignani L., Zaccaria T., Terulla C., Bellazzi L.

Nuclear Laser
Pignataro R., Ignacchiti V.





Grazie per l’attenzione