Approcci molecolari per la diagnosi delle gastroenteriti infettive

Manuela Colosimo

S.O.C. Microbiologia e Virologia

A.O. Dulbecco, P.O Pugliese Catanzaro

Il campione biologico

Hitchcock et al., Effective Approaches to Diagnostic Stewardship of Syndromic Molecular Panels. J Appl Lab Med 2024;9:104-115

The aim of this review article is to describe effective approaches to diagnostic stewardship for syndromic molecular panels to ensure appropriate test utilization and quality assured results.

Pannelli sindromici

i pannelli sindromici sono saggi di diagnostica molecolare in grado di rilevare in tempi rapidi, a partenza da campione primario, la presenza di molteplici target rappresentativi dei patogeni prevalenti per le varie sindromi cliniche.

Amrud et al., A comparison of the Allplex™ bacterial and viral assays to conventional methods for detection of gastroenteritis agents. BMC Res Notes 2018;11:514

	Conventional methods	Allplex assays
Bacteria		
Salmonella spp.	1	2
Shigella spp.[a]	1	1
Campylobacter spp.	4	5
Yersinia enterocolitica	1	2
Clostridium difficile toxin B[a]	9	15
Aeromonas spp.[b]	0	3
Vibrio spp.[b]	0	0
E. coli O157	0	1
Shiga toxin producing *E. coli* (non-*E. coli* O157)	NA	2
Enteropathogenic *E. coli*	NA	5
Enterotoxigenic *E. coli*	NA	0
Enteroaggregative *E. coli*	NA	3
Hypervirulent *Clostridium difficile*	NA	1
Viruses		
Norovirus GII	5[c]	26
Norovirus GI	0	0
Rotavirus	2	4
Adenovirus	0	1
Sapovirus	1[c]	3
Astrovirus	0	2
Small round virus	1	0

[a] Only 91/135 samples were tested for *C. difficile* using conventional methods

[b] Only 65/135 samples were tested for *Aeromonas* and *Vibrio* spp. using conventional methods

[c] Identified as "small round viruses" by EM

Nello studio prospettico il saggio Allplex ha rilevato oltre il doppio di agenti patogeni batterici e virali rispetto ai metodi convenzionali ed è stato anche in grado di rilevare un'elevata percentuale di batteri nei campioni archiviati con colture positive.

Anche il rilevamento di agenti patogeni batterici mediante il saggio Allplex è stato più rapido rispetto ai metodi convenzionali, richiedendo circa 4 ore rispetto alle 24-72 ore necessarie per la coltura e l'identificazione dei batteri.

Gli agenti patogeni batterici sono stati rilevati in 16/135 (11,9%) campioni con metodi convenzionali e in 34/135 (25,2%) con AGPA.

Binnicker MJ multiplex molecular panels for diagnosis of gastriintestinal infection: performance, result interpretation, and cost-effectiveness
J clin Microbiology 2015; 53(12)

I pannelli GI multiplex identificano l'acido nucleico microbico (DNA o RNA)

I pannelli hanno rilevato un aumento del 21,1% di coinfezioni rispetto all'8,3% con i metodi di routine, ed il tasso di positività dei patogeni gastrointestinali da 2 a 4 volte rispetto ai metodi convenzionali.

Numerosi agenti patogeni (norovirus, rotavirus, adenovirus, astrovirus, *Salmonella*) presenti in questi pannelli possono essere presenti sia nelle feci di individui asintomatici o venire eliminati per lunghi periodi dopo la risoluzione della malattia.

C. difficile è uno degli organismi più comuni rilevati, risulta poi importante valutare se rappresenti una vera infezione associata a una malattia o una colonizzazione

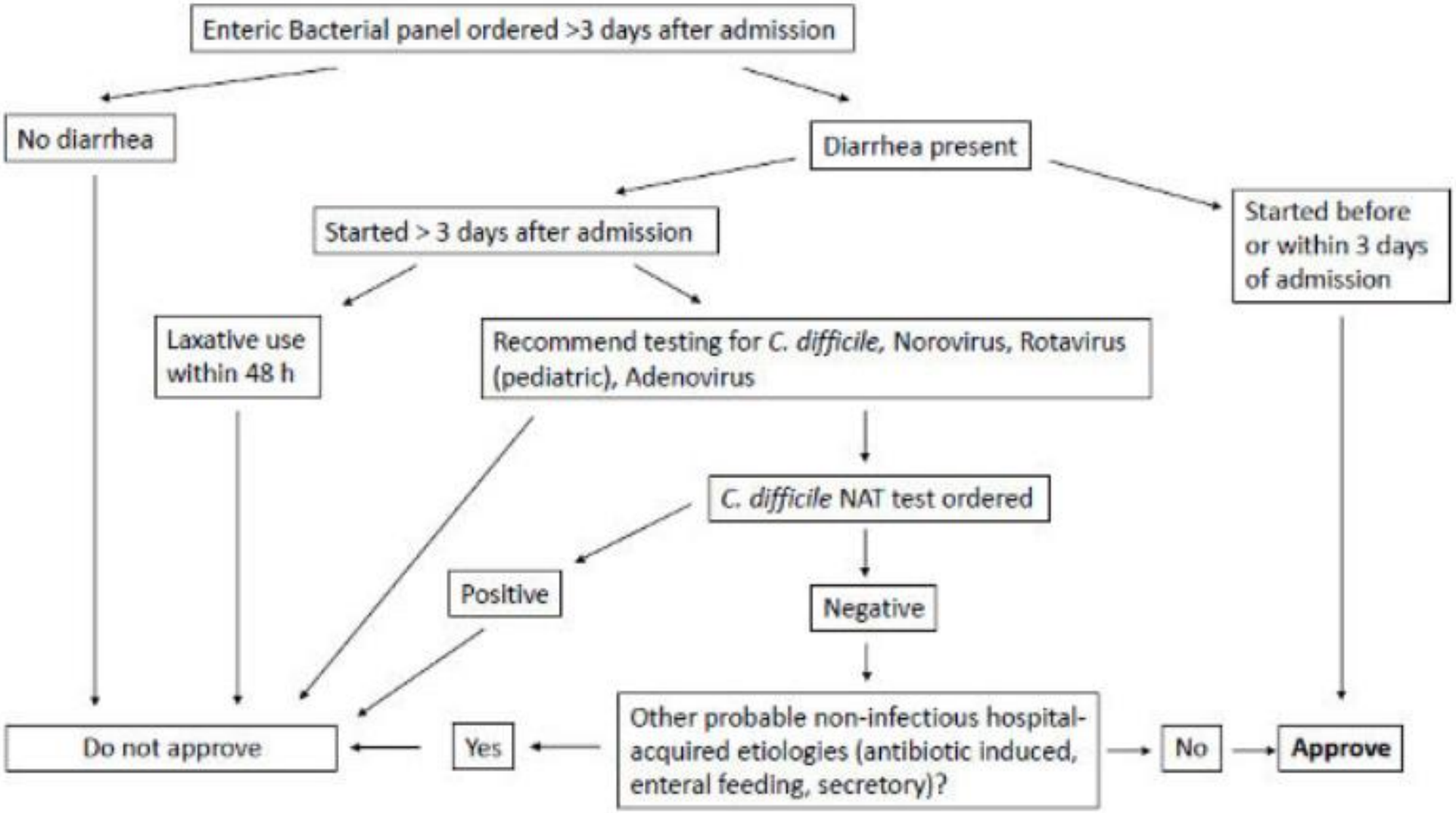
Clark S, Sidlak M, et al Clinical yeld of a molecular diagnostic pannel for enteric pathogens in adult outpatients with diarrhea and validation of guidelines-based criteria for testing Opens forum infect Dis 2019; 6(4)

Seguendo i criteri diagnostici delle linee guida dell'IDSA che suggeriscono di eseguire test diagnostici nei pazienti con febbre, dolore addominale, sangue nelle feci o una condizione di immunocompromissione i test si ridurrebbero del 32,3 %.

Pazienti con viaggi recenti e diarrea >14 gg non hanno dato risposte positive.

I pazienti immunocompromessi mostravano una migliore resa clinica.

Campodónico et al., A diagnostic stewardship approach to prevent unnecessary testing of an enteric bacterial molecular panel. Microbiol Spectr. 2023;11:e0294523.



Tarr et al., Enteric Pathogen Testing Importance for Children with Acute Gastroenteritis: a Modified Delphi Study.
Microbiol Spectr. 2022;10(5):e0186422

I pannelli molecolari multiplex possono potenzialmente facilitare i test per tutti i patogeni identificati come importanti in ambito clinico e di sanità pubblica

Ma l'uso illimitato di pannelli multiplex può portare a cure di scarso valore a causa dell'aumento dei costi e dell'utilizzo del laboratorio con pochi benefici

Testare un numero elevato di agenti patogeni può ulteriormente complicare anche l'interpretazione e non identificare i reali patogeni.

dovrebbero essere abbinati a strategie consolidate di gestione diagnostica valutando l'eventuale soppressione selettiva dei risultati che potrebbero indicare la colonizzazione (ad esempio, *C. difficile* nei bambini <2 anni e l'EPEC in contesti ad alto reddito.

QIAstat-Dx® Gastrointestinal Panel (QIAGEN)

Comprehensive pathogen coverage with QIAstat-Dx

Bacterial

- *Campylobacter* (*C. jejuni, C. upsaliensis, C. coli*)
- *Clostridium difficile* (toxin A/B)
- Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)/*Shigella*
- Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
- Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) *lt/st*
- *Plesiomonas shigelloides*
- *Salmonella spp.*
- Shiga-like toxin-producing *E. coli (STEC) stx1/stx2** (including specific identification of *E. coli* O157 serogroup within STEC)
- *Vibrio vulnificus*
- *Vibrio parahaemolyticus*
- *Vibrio cholerae*
- *Yersinia enterocolitica*

Viral

- Adenovirus F40/41
- Astrovirus
- Norovirus (GI, GII)
- Rotavirus A
- Sapovirus (GI, GII, GIV, GV)

Parasitic

- *Cryptosporidium*
- *Cyclospora cayetanensis*
- *Entamoeba histolytica*
- *Giardia lamblia*

FILMARRAY™ GI Panel (BioMerieux)

FILMARRAY™ GI Panel targets:

Bacteria	Diarrheagenic E. coli/Shigella
▸ Campylobacter (jejuni, coli & upsaliensis) ▸ Clostridium difficile (Toxin A/B) ▸ Plesiomonas shigelloides ▸ Salmonella ▸ Yersinia enterocolitica ▸ Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus, & cholerae) ▸ Vibrio cholerae	• E. coli O157 • Enteroaggregative E. coli (EAEC) • Enteropathogenic E. coli (EPEC) • Enterotoxigenic E. coli (ETEC) lt/st • Shiga-like toxin-producing E. coli (STEC) stx1/stx2 E. coli O157 • Shigella/Enteroinvasive E. coli (EIEC)
Viruses	**Parasites**
▸ Adenovirus F 40/41 ▸ Astrovirus ▸ Norovirus GI/GII ▸ Rotavirus A ▸ Sapovirus (I,II, IV, and V)	▸ Cryptosporidium ▸ Cyclospora cayetanensis ▸ Entamoeba histolytica ▸ Giardia lamblia

BD MAX enteric panel, viral e bacterial (BD)

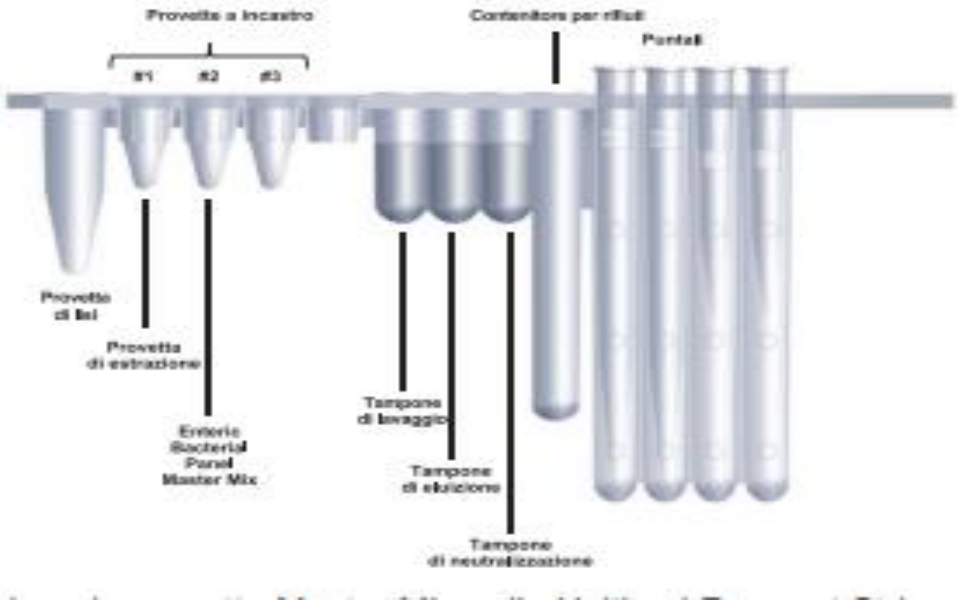


Figura 3: caricare i rack sul BD MAX System.

- Il sistema BD MAX enteric è un test PCR in tempo reale che consente di identificare l'eventuale presenza di 5 dei virus che più frequentemente possono determinare diarrea Norovirus GI e GII, Rotavirus A, Adenovirus F40/41, Sapovirus (genogruppi I, II, IV, V) e Astrovirus umano (hAstro).
- Il sistema BD MAX enteric bacterial, identifica Salmonella spp., Campylobacter spp, Shigella spp./E. coli (EIEC), Shiga toxin 1 & 2 (STEC), Plesiomonas shigelloides, Vibrio spp, E. coli (ETEC) e Yersina enterocolitica
- Il sistema BD MAX parasite identifica Giardia lamblia, Cryptosporidium (C. hominis and C. parvum) ed Entamoeba histolytica

Allplex™ Gastrointestinal Full Panel Assay (SEEGENE)

Pannello 1

Virus

- Norovirus GI
- Norovirus GII
- Rotavirus
- Adenovirus
- Astrovirus
- Sapovirus

Pannello 2

Batteri (I)

- *Campylobacter* spp.
- *Clostridium difficile* toxin B
- *Salmonella* spp.
- EIEC* / *Shigella* spp.
- *Vibrio* spp.
- *Yersinia enterocolitica*
- *Aeromonas* spp.

Pannello 3

Batteri (II)

- *Clostridium difficile* hypervirulent
- *E. coli* O157
- EHEC* (*stx1/2*)
- EPEC* (*eaeA*)
- ETEC* (*lt/st*)
- EAEC* (*aggR*)

Pannello 4

Parassiti

- *Giardia lamblia*
- *Entamoeba histolytica*
- *Cryptosporidium spp.*
- *Blastocystis hominis*
- *Dientamoeba fragilis*
- *Cyclospora cayetanensis*

Vantaggi

- Rapida diagnosi eziologica
- Assenza di sospetto di natura eziologica
- Riduzione di TAT

Svantaggi

- Costi elevati
- Non coprono tutti i microrganismi responsabili di infezione
- Negatività non vuol dire assenza di infezione
- Difficoltà sull'interpretazione dei risultati positivi, soprattutto nelle coinfezioni.
- Non danno indicazioni sulla terapia.
- Valutazione CRITICA delle richieste e dei risultati
- NON SOSTITUISCONO le metodiche diagnostiche tradizionali
- La rilevazione di un marcatore target non implica che l'organismo corrispondente sia l'agente eziologico dell'infezione o dei sintomi clinici.
- La rilevazione di genoma non sempre corrisponde ad un germe vitale.
- La rilevazione di acidi nucleici di virus, parassiti e batteri dipende da prelievo, manipolazione, trasporto, conservazione e caricamento corretto del campione.