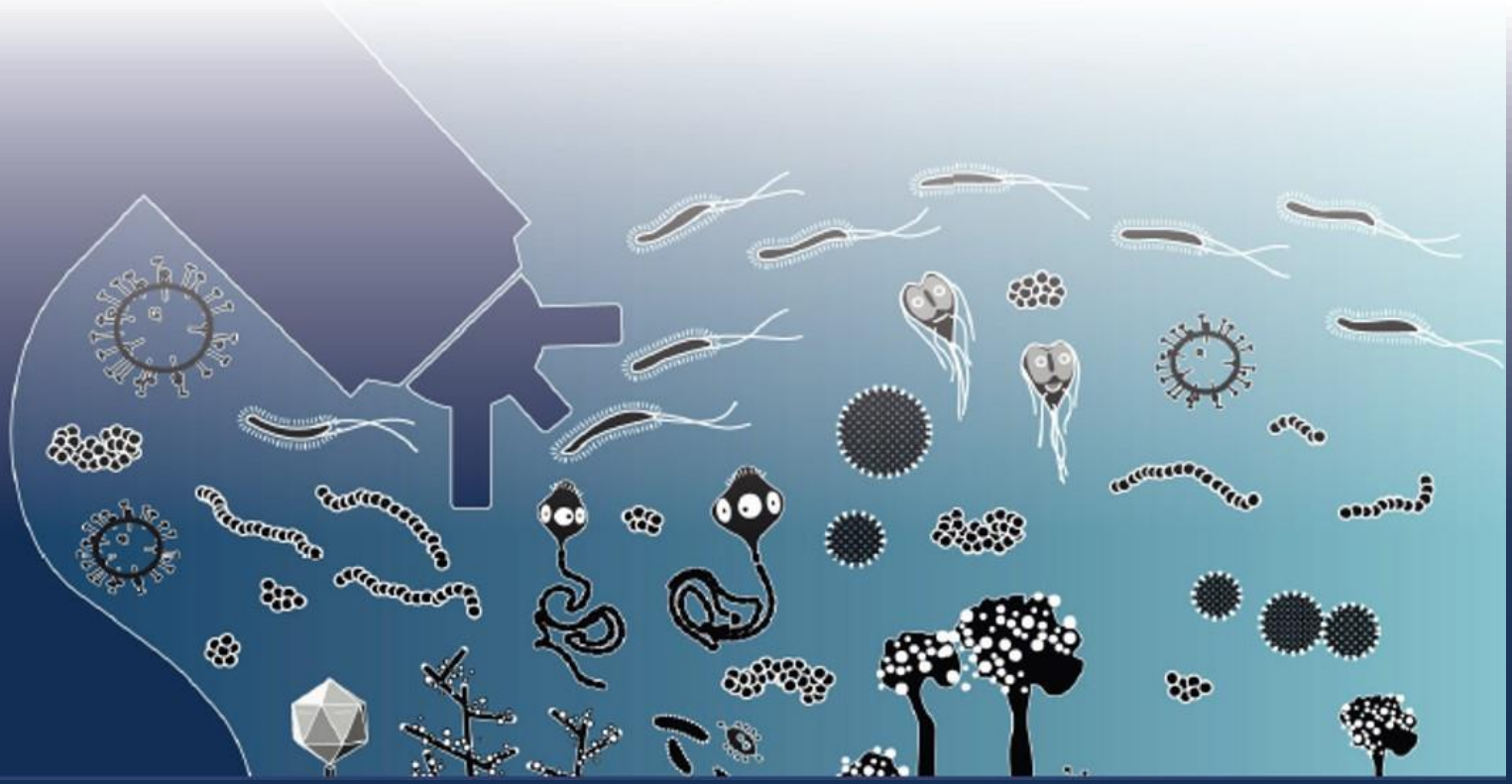
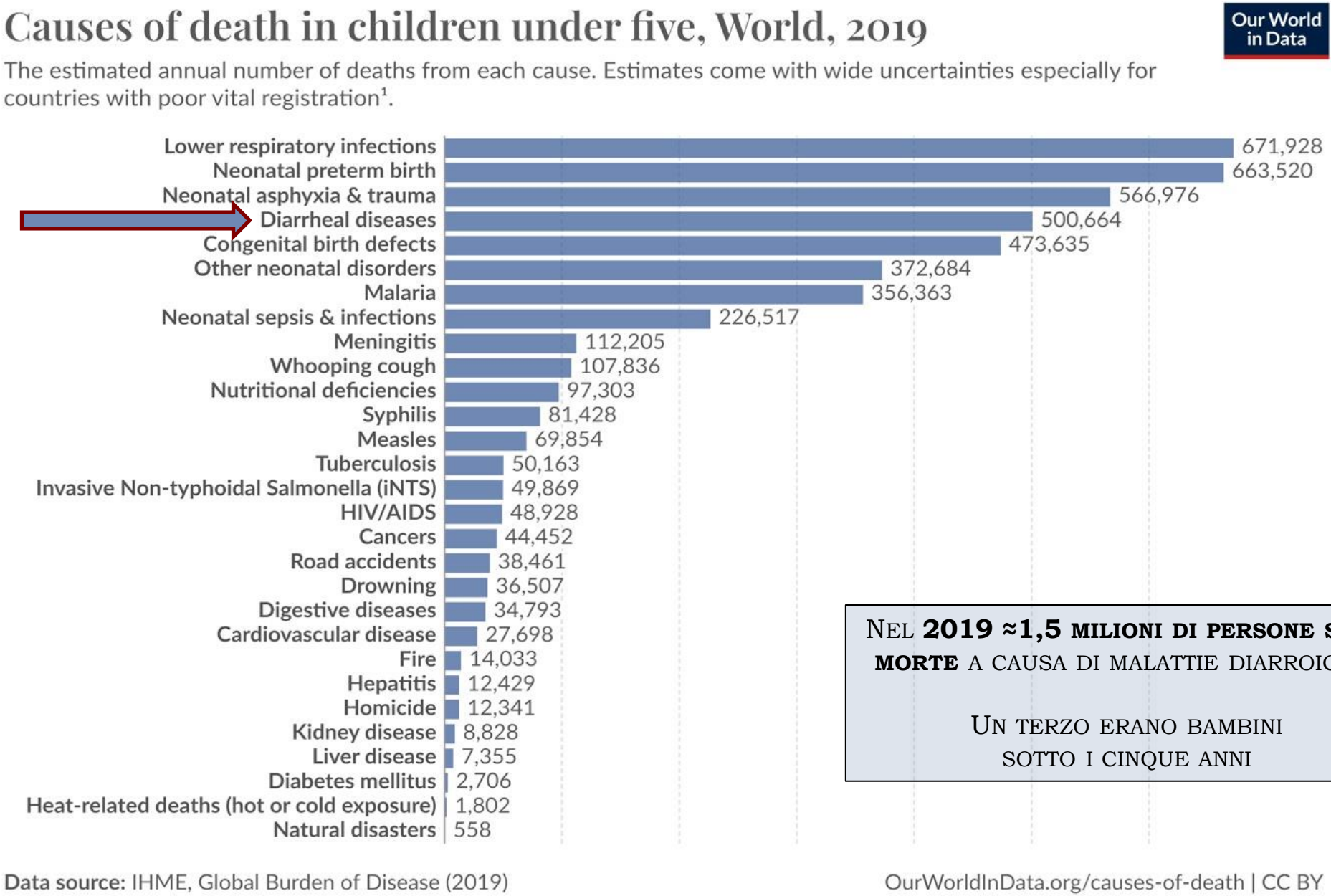
# Gastroenteriti infettive: presentazione del percorso AMCLI

**Stefano Andreoni**
SCDO Microbiologia e Virologia
Azienda Ospedaliero/Universitaria Maggiore della Carità - Novara



# Diarrheal Diseases

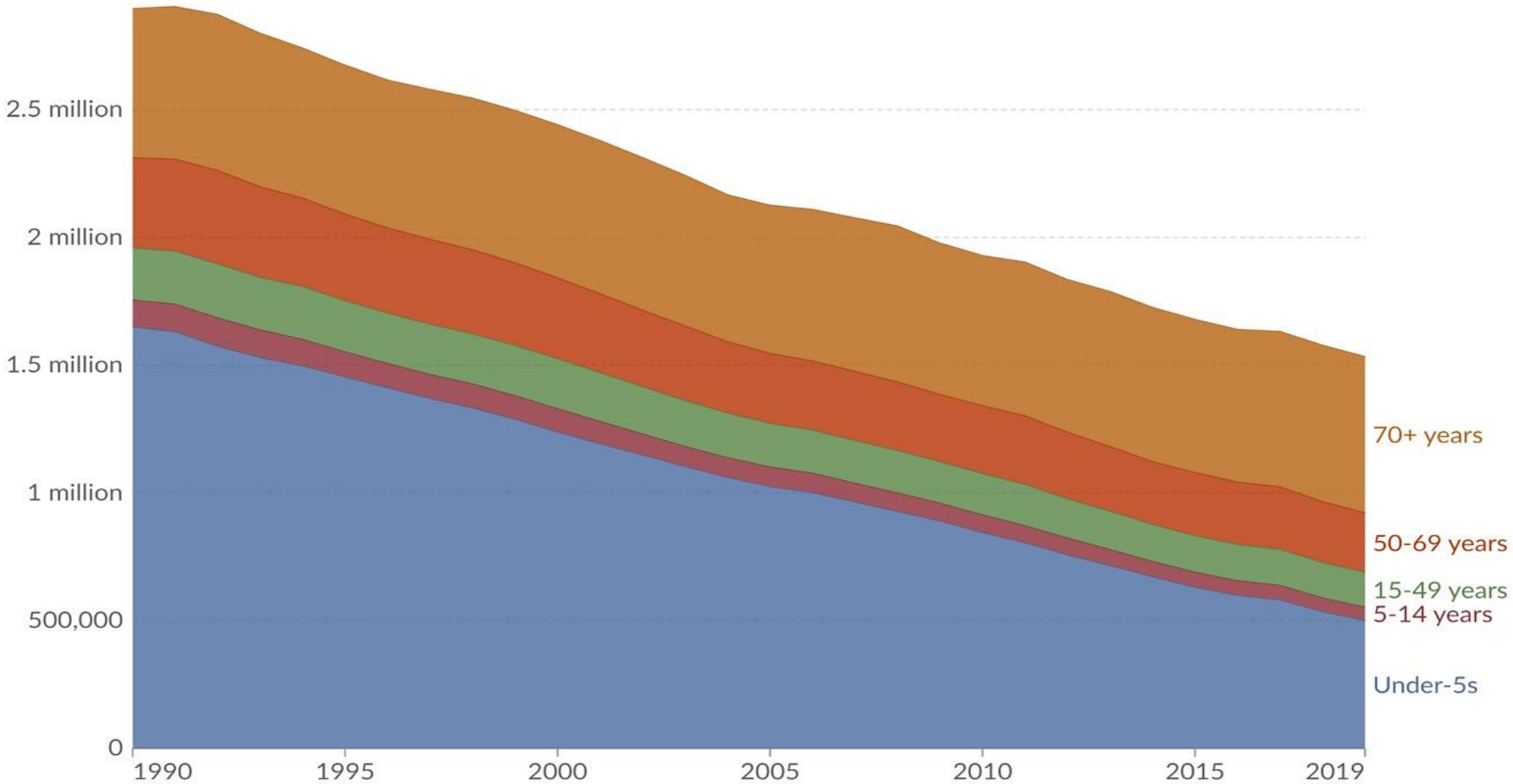



NEL **2019 ≈1,5 MILIONI DI PERSONE SONO MORTE** A CAUSA DI MALATTIE DIARROICHE.

UN TERZO ERANO BAMBINI SOTTO I CINQUE ANNI

# Diarrheal disease deaths, by age, World

Estimated annual number of deaths from diarrheal diseases[1], by age group.

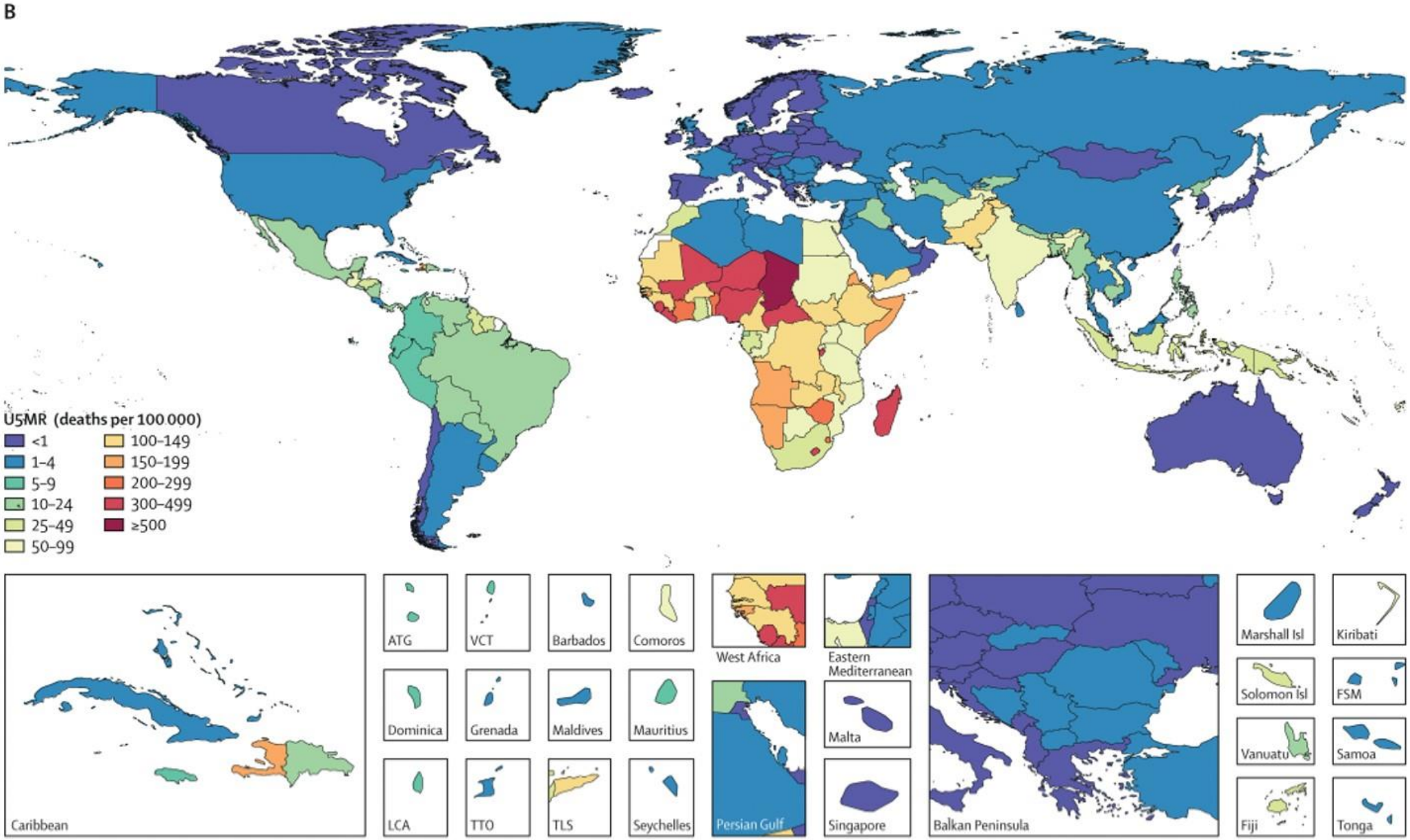



**Data source:** IHME, Global Burden of Disease (2019)

OurWorldInData.org/diarrheal-diseases | CC BY

# Diarrhoea mortality rate in 2016

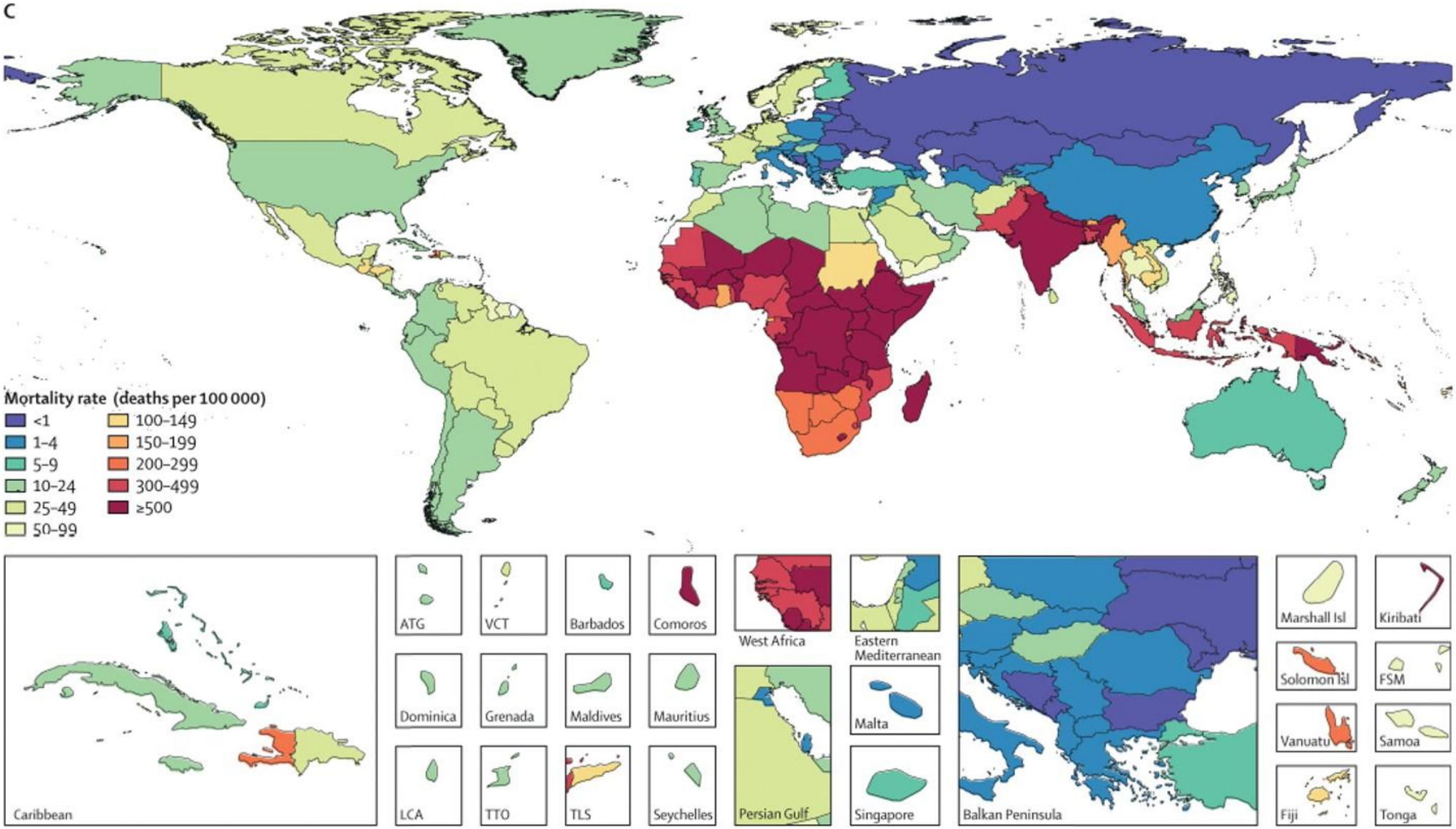
Diarrhoea mortality rate in children younger than 5 years (B)




(GBD Diarrhoeal Disease Collaborator, Lancet Infect Dis, 2018)

# Diarrhoea mortality rate in 2016

Diarrhoea mortality rate in **adults older than 70 years (C)**

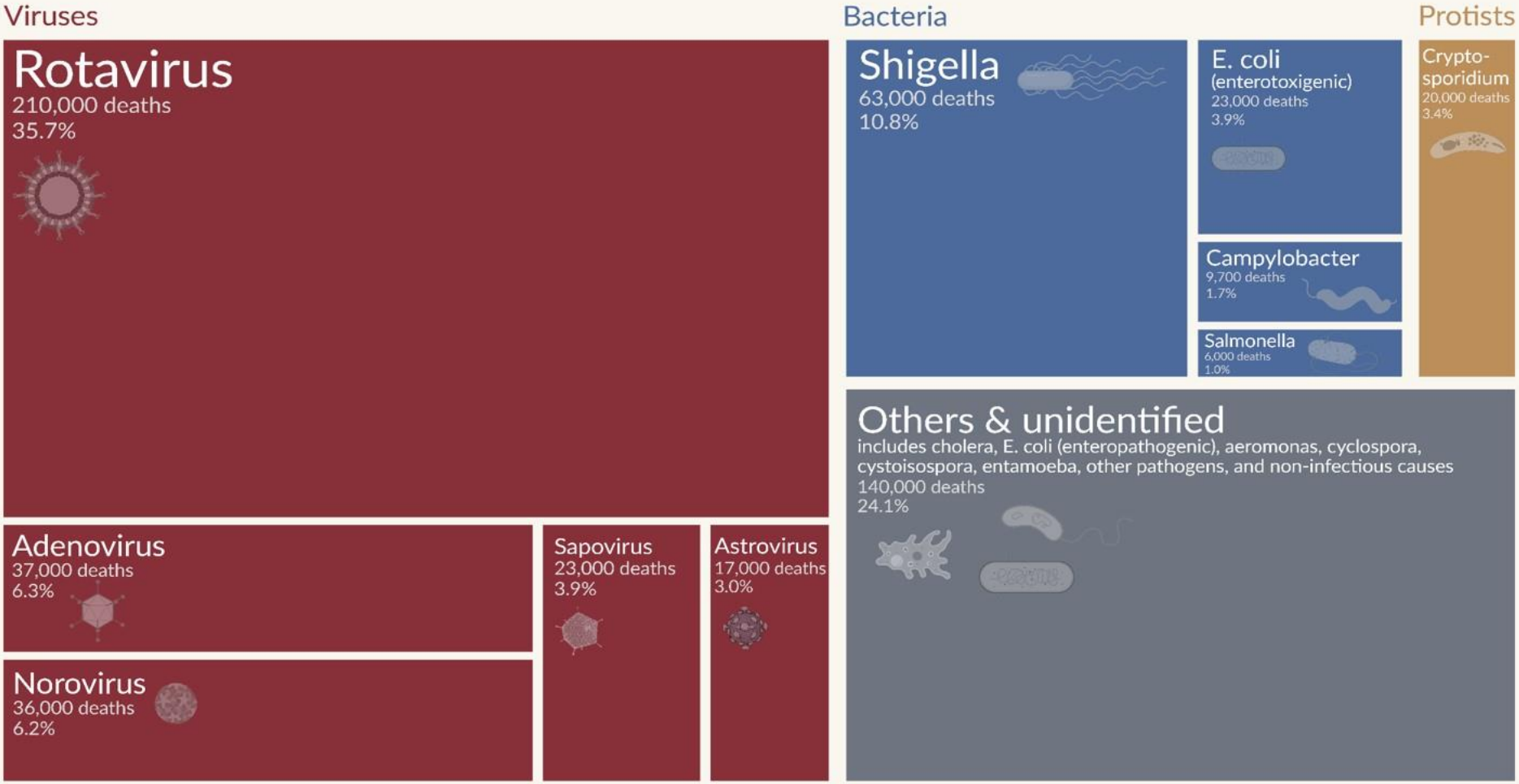



(GBD Diarrhoeal Disease Collaborator, Lancet Infect Dis, 2018)

# Which pathogens are responsible for deaths from diarrheal disease in children?

Our World in Data

The total size shows the estimated global number of diarrheal deaths in children under five: 580,000 deaths per year.
The size of each box is proportional to the estimated share of deaths caused by each pathogen.




Note: annual estimates were made according to data from 2017 to 2018.



Licensed under CC-BY by the author Saloni Dattani

# Eziologia batterica di enteropatie

## Batteri associati ad infezioni intestinali

*E.coli enteropatog*
*Campylobacter spp*
*Salmonella spp.*
*Shigella*
*Yersinia enterocol*
*Vibrio spp.*
*Aeromonas*
*Plesiomonas*

## Batteri associat a diarree nosocor

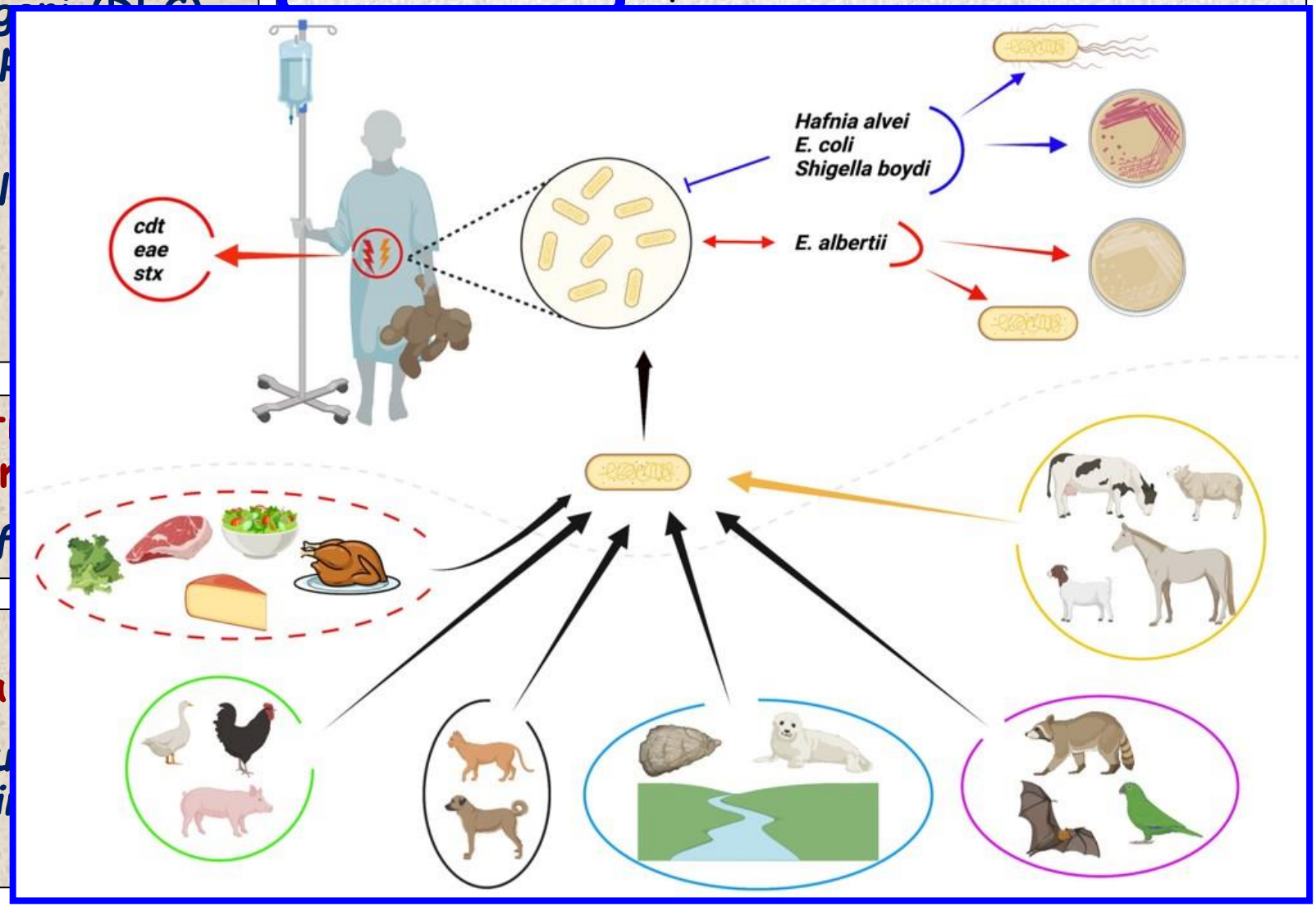
*Clostridioides diff*

## Batteri implicati in tossinfezioni a

*Staphylococcus au*
*Clostridium perfri*
*Bacillus cereus*

## Patogeni emergenti

*Escherichia albertii* implicato in casi di malattia diarroica in



# Gastroenteriti virali

| Virus | Manifestazione clinica | Incubazione /durata |
|---|---|---|
| Rotavirus ① | principale causa di diarrea nei bambini | 1-3 giorni/ 5-8 giorni |
| Norovirus ① | Infezioni in adulti e bambini<br>Forme virali epidemiche | 1-3 giorni/ 1-3 giorni |
| Adenovirus | diarrha nei bambini | 7-8 giorni/ 8-12 giorni |
| Astrovirus | Infezioni principalmente in bambini ed anziani | 1-4 giorni/ 1-4 giorni |

- Responsabili fino a 3/4 di tutte le diarree infettive.
- La gastroenterite virale è la seconda più comune malattia virale dopo le infezioni del tratto respiratorio superiore.
- Nei paesi in via di sviluppo, la gastroenterite virale è uno dei principali killer di bambini denutriti ①.

① Stime di mortalità annuale da Rotavirus (400.000) e Norovirus (250.000)
(Tate, Lancet Infect Dis, 2012; Patel, NEJM, 2011)

**Altri virus implicati in gastroenteriti:**

- Sapoviruses
- Torovirus
- Enteroviruses
  (some Echo and Coxsackie A)

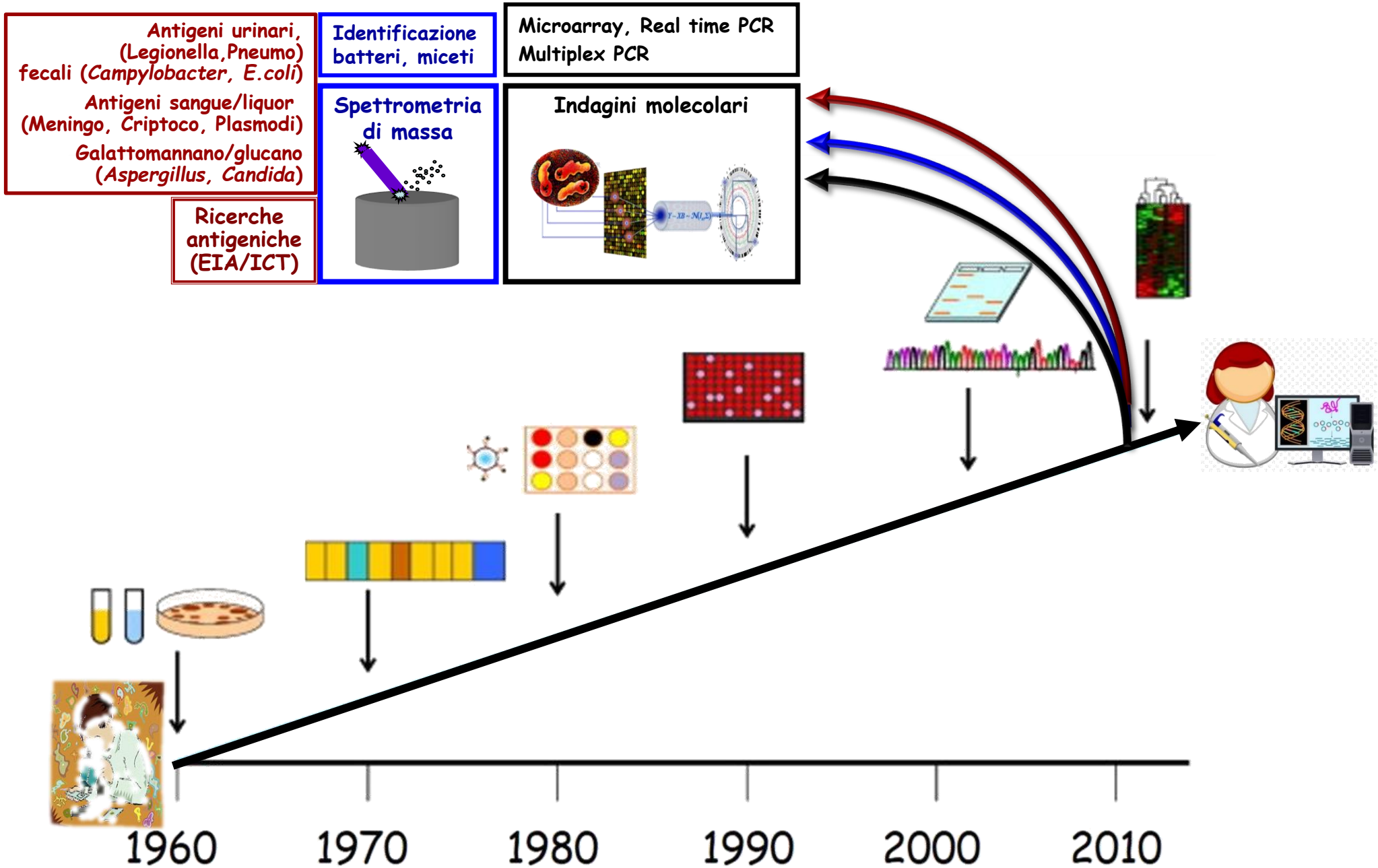
**In pz immunocompromessi:**

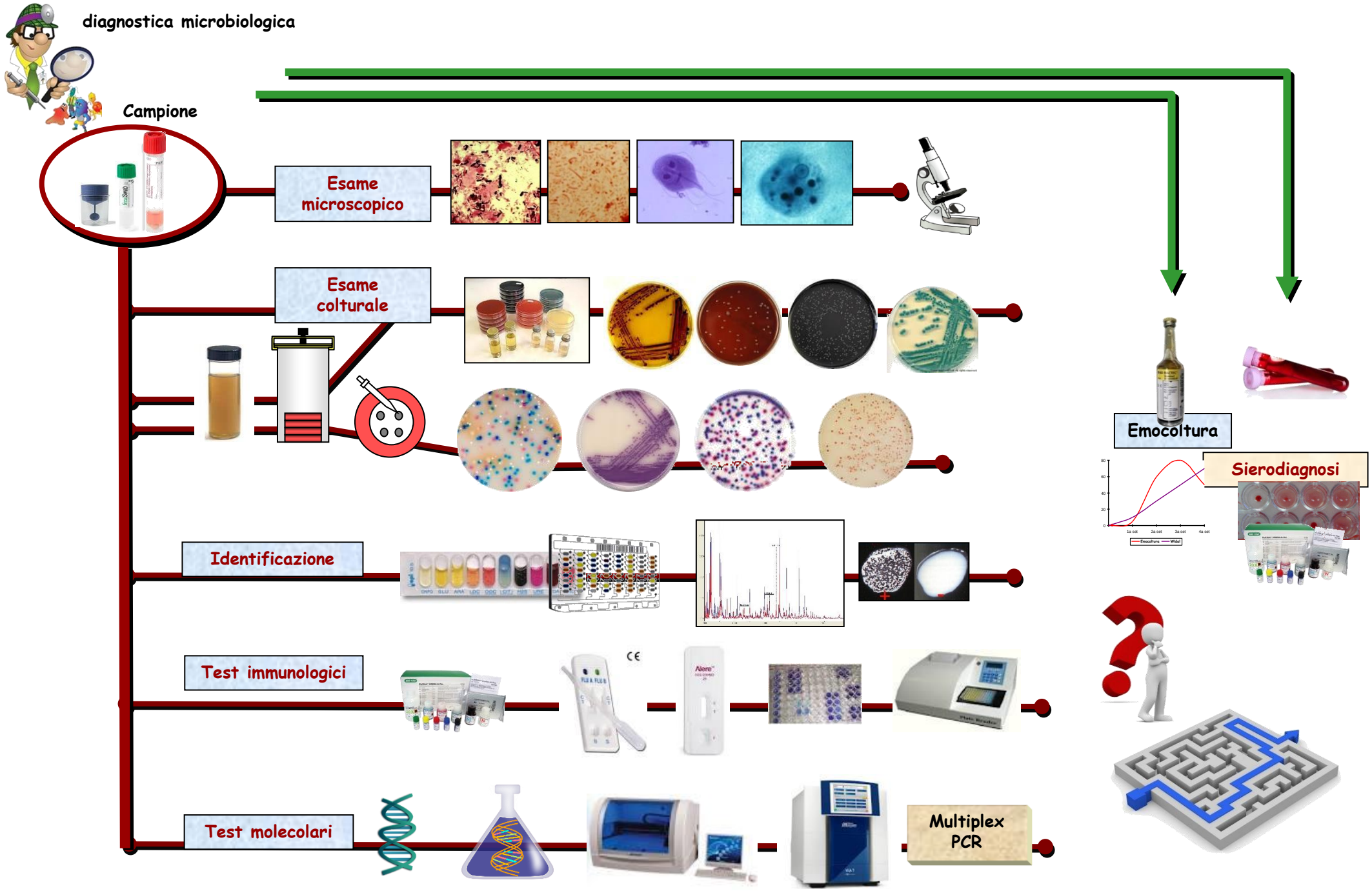
- HIV
- CMV, HSV, VZV

**Potenziali sospetti:**

- Bocavirus
- Saffold viruses
- Cosaviruses
- Saliviruses / Klasseviruses
- Aichi virus
- Parechoviruses
- Enteric Coronaviruses
- Polyomavirus MW
- Picobirnaviruses
- SRSV (Small Round Structured Viruses)
- SRV (Small Round Viruses)
- PMMV

# Nuove realtà diagnostiche in microbiologia: da metodiche convenzionali a innovative




diagnostica microbiologica
Campione
Esame microscopico
Esame colturale
Identificazione
Test immunologici
Test molecolari
Multiplex PCR
Emocoltura
Sierodiagnosi

# Diarree d'origine infettiva

La presentazione clinica generalmente non indicativa di uno specifico patogeno

Metodi tradizionali laboriosi con *performance* non ottimali

# Percorsi diagnostici

# Clinical Laboratory Practices for the Isolation and Identification of *Campylobacter* in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet)

## Specimen Collection and Transport Methods Among All Laboratories That Reported On-site Testing for *Campylobacter*

| Question (No. of Responses) | No. (%) of Laboratories (N = 411) | |
|---|---|---|
| **Use of any transport medium (n = 345)** | | |
| Yes | 336 | (97.4) |
| No | 9 | (2.6) |
| **Transport medium used (n = 294)** | | |
| Alpha Tec enteric transport medium | 2 | (0.7) |
| Amies | 15 | (5.1) |
| Amies and another | 4 | (1.4) |
| Cary-Blair | 162 | (55.1) |
| Cary-Blair and another | 81 | (27.6) |
| Stuart | 25 | (8.5) |
| Stuart and Alpha Tec enteric medium | 1 | (0.3) |
| Other | 4 | (1.4) |

| Type of culture medium used for plating (n = 397) | | |
|---|---|---|
| Campy blood agar plate | 204 | (51.4) |
| Campy blood agar plate and another | 2 | (0.5) |
| Campy CVA | 150 | (37.8) |
| Campy CVA and another | 6 | (1.5) |
| Campy CEFEX | 1 | (0.3) |
| Campy CEFEX and another | 2 | (0.5) |
| Skirrow | 5 | (1.3) |
| CSM | 16 | (4.0) |
| CCDA, CAT, and another | 1 | (0.3) |
| Other | 10 | (2.5) |

| Mean time from medical provider to laboratory (n = 356) | | |
|---|---|---|
| ≤2 | 165 | (46.3) |
| 3-4 | 72 | (20.2) |
| 5-6 | 30 | (8.4) |
| 7-8 | 21 | (5.9) |
| 9-10 | 4 | (1.1) |
| 11-12 | 10 | (2.8) |
| 13-24 | 37 | (10.4) |
| 25-48 | 13 | (3.7) |
| >48 | 4 | (1.1) |

**411 laboratori** che eseguono ricerche per Campylobacter.

In tutto, ci sono stati **106 gli algoritmi** di test tra i 214 laboratori con un profilo completo;

Solo **16 laboratori** sono stati pienamente aderenti alle linee guida esistenti.

## Summary of reference or "gold standard" methods

| Target(s) | Reference method available at MHDL[b] | Reference(s)[a] |
|---|---|---|
| *E. coli* | Culture: MAC with sorbitol | 25, 26 |
| *E. coli* O157:H7 | API20E and ECO157 (slide) H7 (tube) | 25, 26 |
| Shiga toxins | Meridian Premier EHEC EIA kit (catalog no. 608096); real-time PCR (*stx*1 *stx*2) | 27, 28 |
| *Salmonella* spp. | Culture: XLD, MAC, SS, BS, BG GN, Sel; API20E serology (O and H antigens) | 25, 26 |
| *Shigella* spp. | Culture: XLD, MAC, SS GN, Sel; API20E serotyping | 25, 26 |
| *Yersinia* spp. | Culture: *Yersinia* agar at 25°C; API20E, MIDI, MicroSEQ (16S sequencing) | 25, 29 |
| *Campylobacter* spp. | Culture: *Campylobacter* agar at 42°C, Gram stain; catalase, oxidase, hippurate, indoxyl acetate,MIDI, MicroSEQ (16S sequencing) | 25, 30 |
| *Vibrio cholerae* | TCBS and alkaline peptone broth; API20E, Gram stain, oxidase; MIDI, MicroSEQ (16S sequencing) | 25, 26, 31 |
| *C. difficile* (A/B toxins) | Cepheid Xpert *C. difficile* | |
| *Cryptosporidium* spp. | Meridian EIA Crypto/Giardia (catalog no. 250050); microscopy | 32-33 |
| *Guardia lamblia* | Meridian EIA Crypto/Giardia (catalog no. 250050); microscopy, trichrome stain | 32-34 |
| *Entamoeba* spp. | Microscopy, trichrome stain, CDC real-time PCR | 27-35, 36 |
| Rotavirus A | CDC real-time RT-PCR | 12 |
| Norovirus | CDC real-time RT-PCR | 36 |
| Adenovirus 40/41 | CDC real-time RT-PCR | 37 |

**Le diagnosi di laboratorio delle GE sono basate su una combinazione di tecniche convenzionali, inclusa la microscopia, la coltura, la rilevazione di antigeni e indagini innovative molecolari (Real-time PCR singole).**

(Navidad J.F. et al., JCM, 2014)

XXXVIII CONGRESSO NAZIONALE
AMCLI 2009

associazione microbiologi clinici italiani

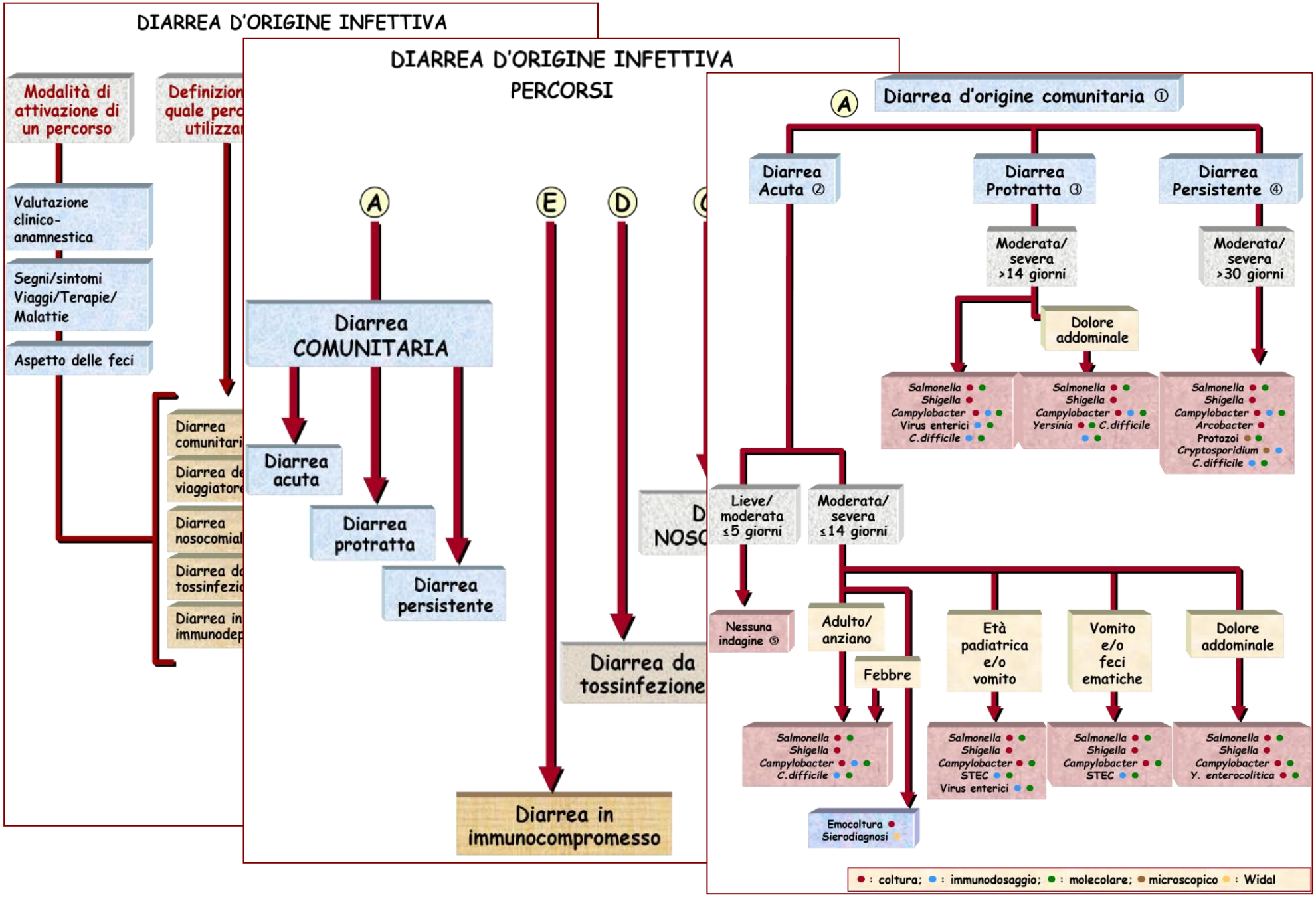
# XXXVIII Congresso Nazionale AMCLI

Rimini, 17 – 20 novembre 2009

## Diarrea e gastroenteriti infettive

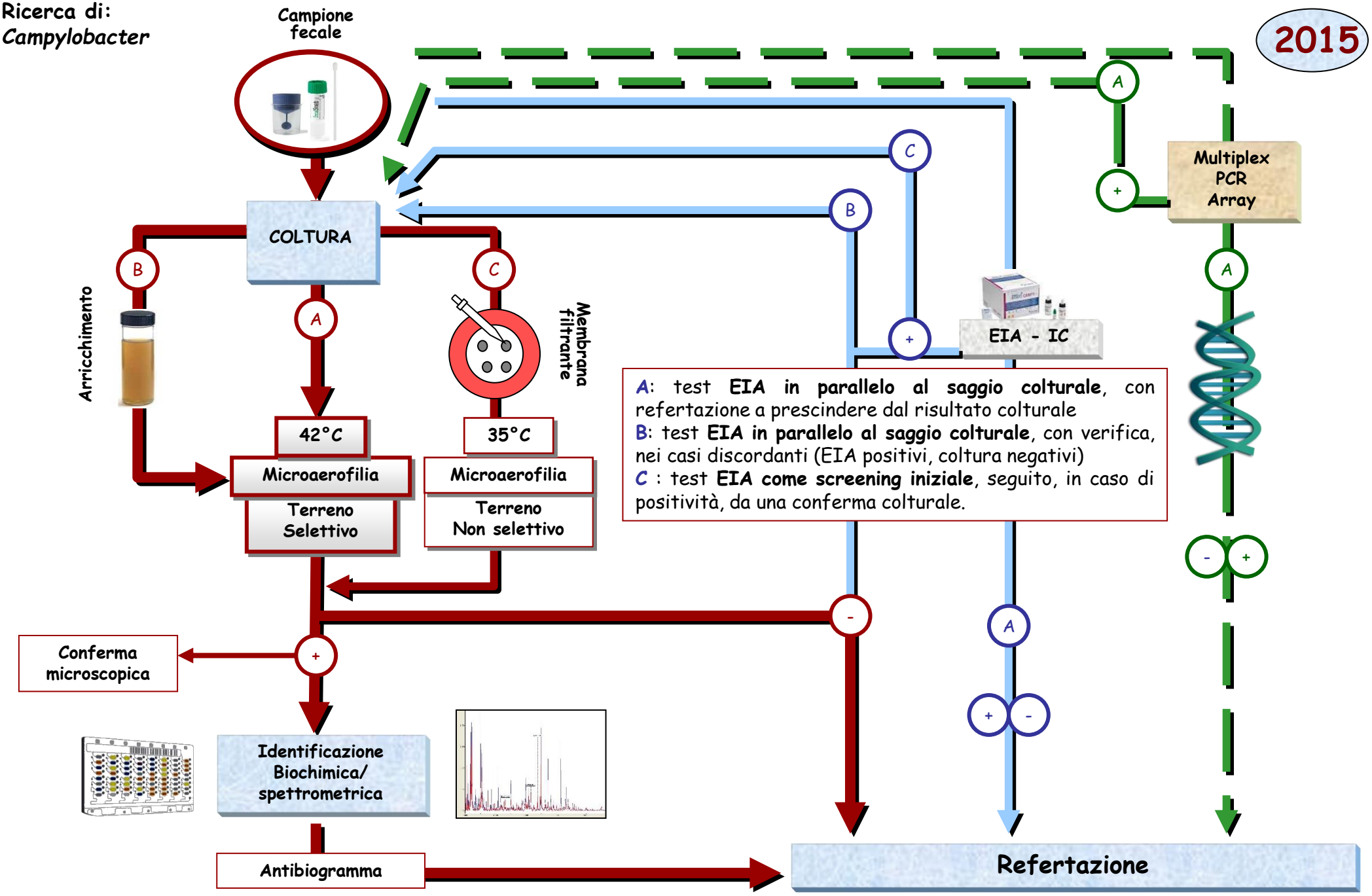
## Presentazione
## Percorsi diagnostici

*Stefano Andreoni*


DIARREA D'ORIGINE INFETTIVA
Modalità di attivazione di un percorso
Valutazione clinico-anamnestica
Segni/sintomi Viaggi/Terapie/ Malattie
Aspetto delle feci
DIARREA D'ORIGINE INFETTIVA
PERCORSI
A
Diarrea COMUNITARIA
Diarrea acuta
Diarrea protratta
Diarrea persistente
E
Diarrea in immunocompromesso
D
Diarrea da tossinfezione
Diarrea d'origine comunitaria ①
Diarrea Acuta ②
Diarrea Protratta ③
Diarrea Persistente ④
Moderata/ severa >14 giorni
Moderata/ severa >30 giorni
Dolore addominale
Salmonella
Shigella
Campylobacter
Virus enterici
C.difficile
Yersinia
Arcobacter
Protozoi
Cryptosporidium
Lieve/ moderata ≤5 giorni
Moderata/ severa ≤14 giorni
Nessuna indagine ⑤
Adulto/ anziano
Febbre
Età padiatrica e/o vomito
Vomito e/o feci ematiche
STEC
Y. enterocolitica
Emocoltura
Sierodiagnosi
● : coltura; ● : immunodosaggio; ● : molecolare; ● microscopico ● : Widal

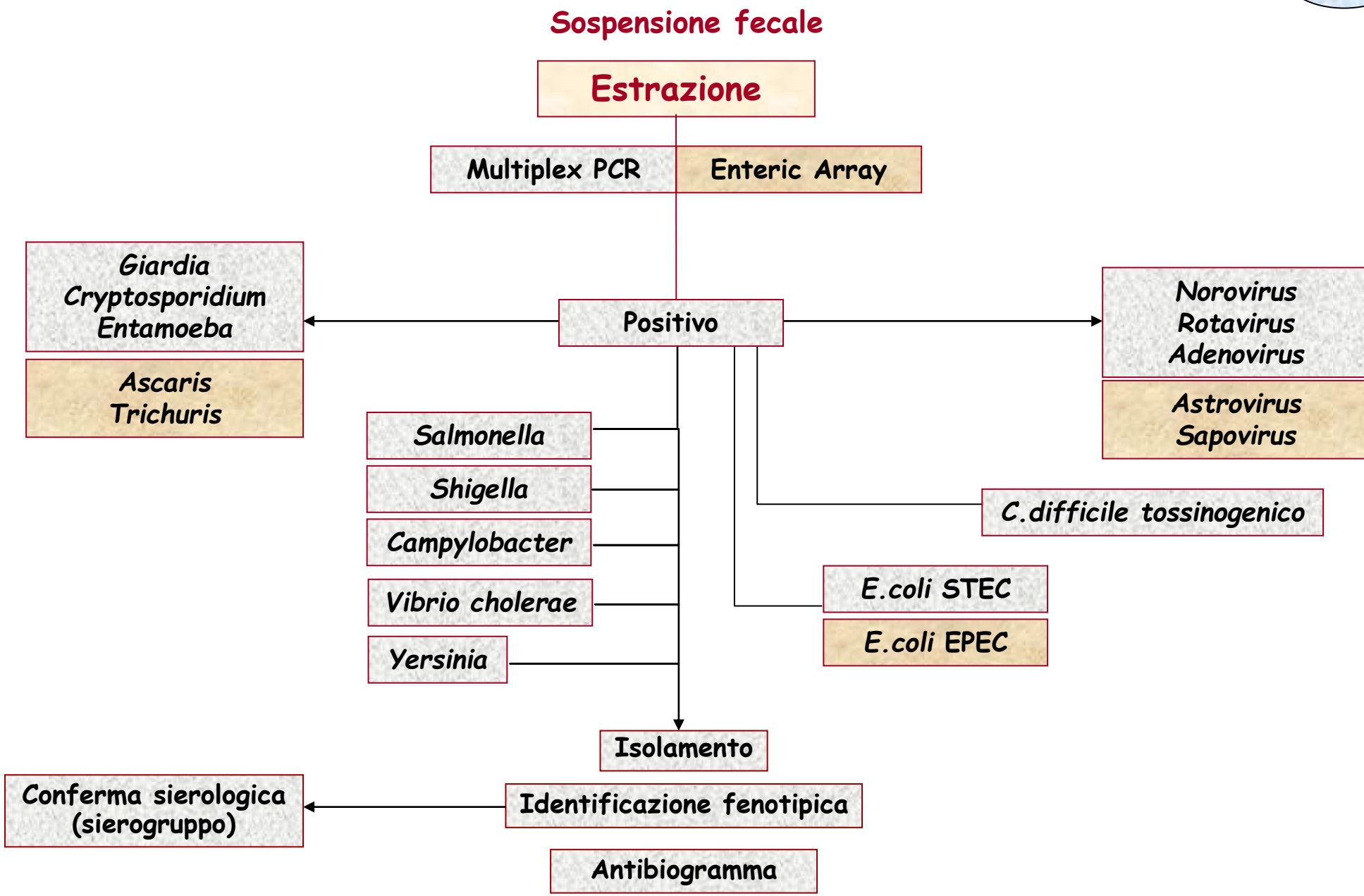
Ricerca di:
*Campylobacter*

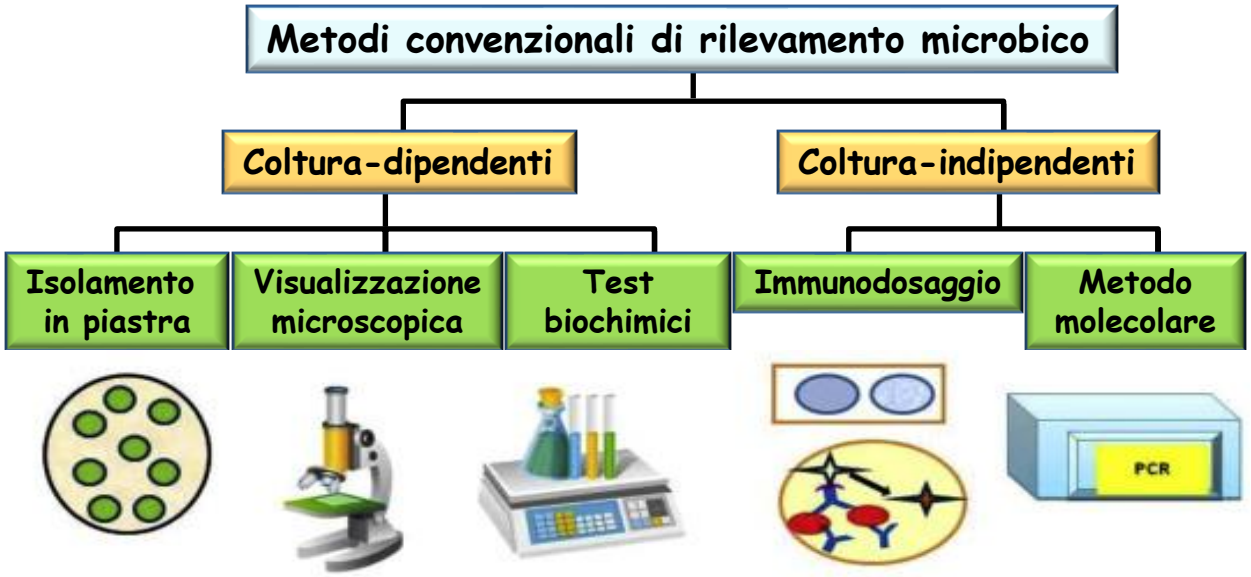
2015



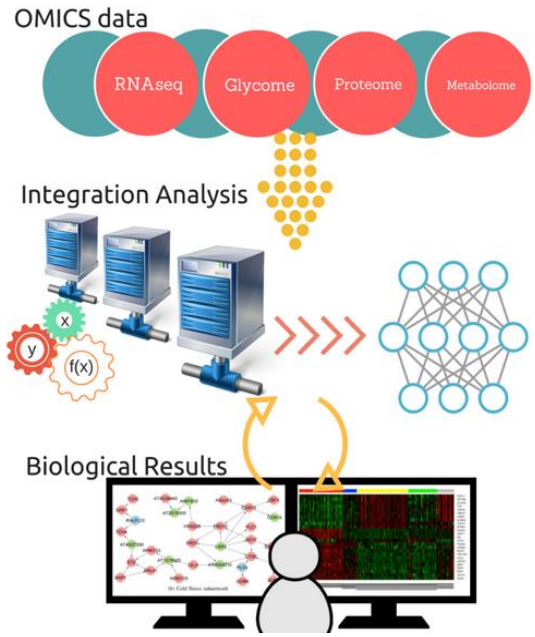
# Possibile algoritmo

2015





Crescita delle tecnologie "omiche"




graduale migrazione dal paradigma "one test, one pathogen", verso approcci multiplex per la diagnosi di malattie infettive.

# RILEVAMENTO SINDROMICO DEI PATOGENI GASTROINTESTINALI

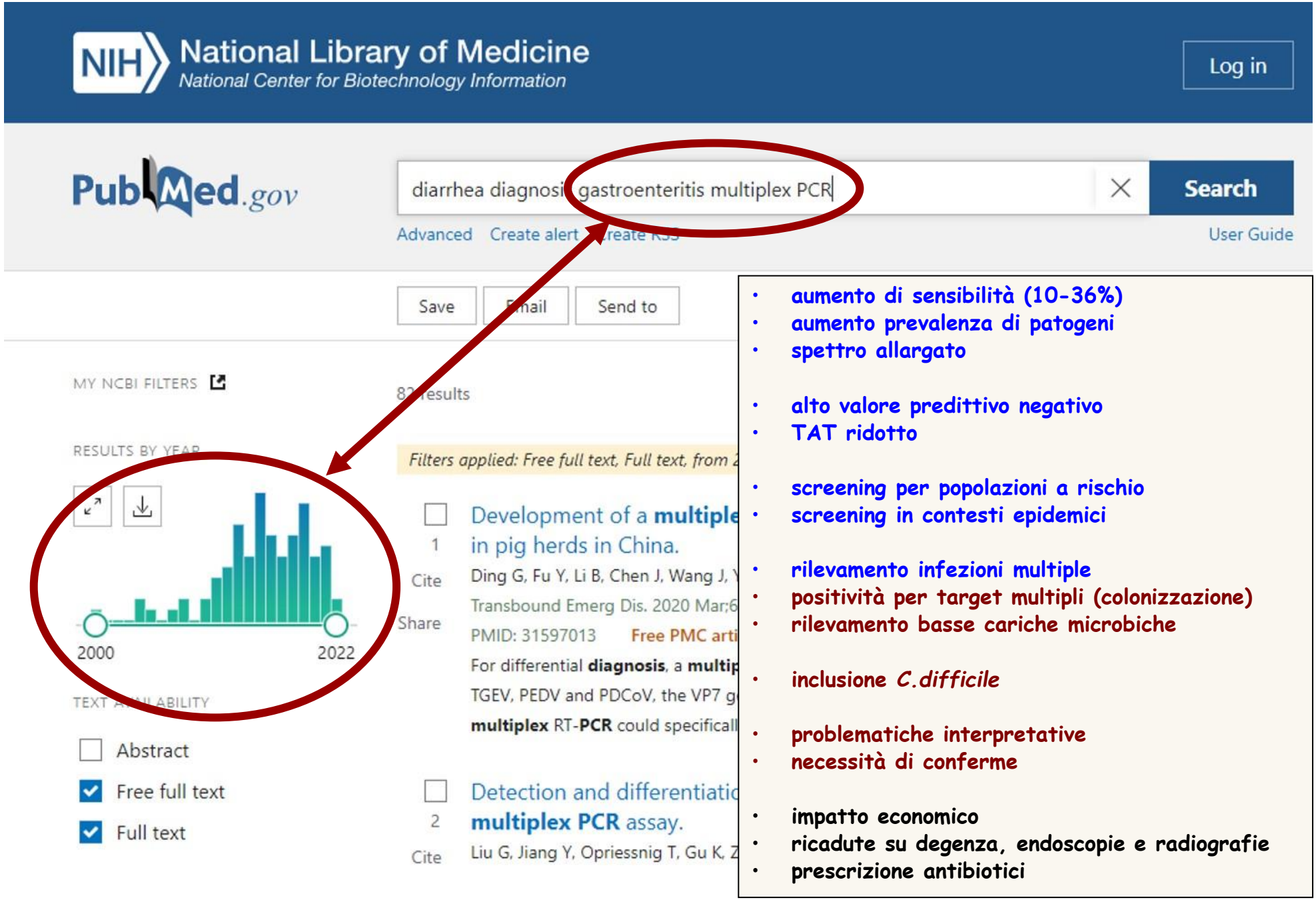
| | SAGGI MOLECOLARI MULTIPLEX | | SAGGI MOLECOLARI MULTIPLI PER CLASSE PATOGENI | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Aeromonas | | ■ | | | | ■ | | ■ | | | ■ | | |
| Campylobacter | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Clostridium difficile | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Clostridium perfringens | | | | | | | | ■ | | | | | |
| EAEC | | ■ | | | | | | | | | ■ | | |
| EPEC | | ■ | | | | | | | | | ■ | | |
| ETEC | ■ | ■ | | | | ■ | | | | | ■ | | |
| STEC | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | | ■ | | |
| E.coli O157 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | ■ | | |
| Listeria monocytogenes | | | | | | | | | | | | | |
| Plesiomonas shigelloides | | ■ | | | | | | | | | ■ | | |
| Salmonella | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Shigella | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ |
| Vibrio | | ■ | | ■ | | | | ■ | | | ■ | | |
| Vibrio cholerae | ■ | ■ | | | | | | | | | ■ | | |
| Yersinia enterocolitica | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | ■ | | |
| Adenovirus | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | ■ | | |
| Astrovirus | | ■ | | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | ■ | | |
| Enterovirus | | | | | | | | | | | ■ | | |
| Norovirus | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | ■ | | |
| Rotavirus | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | ■ | | |
| Sapovirus | | ■ | | | | | | ■ | | | | | |
| Cryptosporidium | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Blastocystis hominis | | ■ | | | | | | | | | ■ | | |
| Dientamoeba fragilis | | | | | | ■ | ■ | | | | | | ■ |
| Cyclospora cayetanensis | ■ | ■ | | | | | | | | | ■ | | |
| Entamoeba histolytica | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Giardia lamblia | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |

(Zhang H., Clin Lab Med, 2016)

# Multiplex GI panels, FDA-cleared

Bard J.D., Clin Lab Med, 2020

| Assay | Turnaround Time | Throughput | Set up | Bacterial Targets | Viral Targets | Parasitic Targets |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Applied BioCode GI Pathogen Panel (GPP) | 4 h | 96-well plate format | Batched | *Campylobacter* spp.<br>*Clostridium difficile* toxin A and B<br>*Salmonella* spp.<br>*Shigella*/enteroinvasive *E coli*<br>Shiga-like toxin producing *E coli*, *E coli* O157<br>Enterotoxigenic *E coli*, Enteroaggregative *E coli*<br>*Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, and *V. cholerae*<br>*Yersinia enterocolitica* | Norovirus GI and GII<br>Rotavirus A<br>Adenovirus F40/41 | *Giardia lamblia*<br>*Cryptosporidium* spp.<br>*Entamoeba histolytica* |
| BDMax Enteric Bacterial Panel | 3 h | 24 tests per instrument | Batched | *Salmonella* spp.<br>*Campylobacter* spp.<br>*Shigella* spp./enteroinvasive *E coli*, Shiga toxin 1 and 2 | | |
| BDMax Extended Enteric Bacterial Panel | 3.5 h | 24 tests per instrument | Batched | *Plesiomonas shigelloides*<br>*Vibrio vulnificus*, *V parahaemolyticus*, and *V cholerae*<br>Enterotoxigenic *E coli*, *Y enterocolitica* | | |
| BDMax Enteric Viral Panel | 3 h | 24 tests per instrument | Batched | | Norovirus GI and GII<br>Rotavirus A, Adenovirus F40/41<br>Sapovirus, Human astrovirus | |
| BDMax Enteric Parasite Panel | 4.5 h | 24 tests per instrument | Batched | | | *G lamblia*<br>*Cryptosporidium* spp.<br>*E histolytica* |
| BioFire bioMérieux FilmArray GI Panel | 1 h | 1 test module per instrument (v2.0)<br>2–12 test modules per instrument (Torch) | On demand | *Campylobacter* spp.<br>*C difficile*<br>*P shigelloides*<br>*Salmonella* spp., *Shigella* spp./enteroinvasive *E coli*<br>*Vibrio* spp.<br>Enteroaggregative *E coli*, Enteropathogenic *E coli*<br>Enterotoxigenic *E coli*<br>Shiga-toxin like producing *E coli*, *E coli O157* | Adenovirus 40/41<br>Astrovirus<br>Norovirus GI and GII<br>Rotavirus<br>Sapovirus | *Cryptosporidium*<br>*Cyclospora cayetanensis*<br>*E histolytica*<br>*Giardia* |
| Hologic Prodesse ProGastro SSCS Assay | 4 h | 96 tests per plate | Batched | *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp.<br>Shiga toxin 1 and 2, *Shigella* spp. | | |
| Luminex Verigene Enteric Pathogens Test | 2 h | 1 test module per instrument (v1.0)<br>6 test modules per instrument (v2.0) | On demand | *Campylobacter* spp.<br>*Salmonella* spp., *Shigella* spp.<br>*Vibrio* spp., *Y enterocolitica*<br>Shiga toxin 1 and 2 | Norovirus GI and GII<br>Rotavirus | |
| Luminex xTAG GI Pathogen Panel | 5 h | 96 tests per plate | Batched | *Campylobacter* spp.<br>*C difficile*<br>*E coli* O157, Enterotoxigenic *E coli*<br>Shiga-toxin like producing *E coli*<br>*Salmonella* spp., *Shigella* spp.<br>*Vibrio cholera* | Adenovirus 40/41<br>Norovirus<br>Rotavirus | *Cryptosporidium*<br>*Entamoeba histolytica*<br>*Giardia* |




- aumento di sensibilità (10-36%)
- aumento prevalenza di patogeni
- spettro allargato

- alto valore predittivo negativo
- TAT ridotto

- screening per popolazioni a rischio
- screening in contesti epidemici

- rilevamento infezioni multiple
- positività per target multipli (colonizzazione)
- rilevamento basse cariche microbiche

- inclusione *C.difficile*

- problematiche interpretative
- necessità di conferme

- impatto economico
- ricadute su degenza, endoscopie e radiografie
- prescrizione antibiotici

# Pannelli molecolari multiplex (GPP) per patogeni gastroenterici

- Rapidità di esecuzione (TAT ridotti)
- Ridotto volume di campione clinico
- Indipendenza dallo «status» del microrganismo
- Elevata sensibilità
- Possibilità di automazione

## Cambiamenti di paradigma

- **Determinazione in ore** anziché in giorni
- **Positività più «estese» - coinfezioni**
- Non più un test un microrganismo (visione patogeno-orientata vs **visione sindrome-orientata**)

## Ricadute

- Ricadute sul piano clinico
- Ricadute sul piano economico
- Ricadute di tipo epidemiologico
- Ricadute sul piano organizzativo

## Nuovi quesiti

- Questi test possono sostituire i metodi tradizionali ?
- Quali pannelli utilizzare ?
- Le performance valgono il costo aggiuntivo ?
- I clinici come recepiranno il cambiamento ?

# Utilizzo di Pannelli molecolari multiplex – pannelli sindromici (PS)

**Strategia restrittiva**: impiego riservato a particolari categorie di pazienti o a particolari condizioni ad elevata criticità
**Strategia estensiva**: utilizzo senza limitazioni in quanto ritenuti appropriati quali test diagnostici di prima linea.

Necessità di comprensione delle **caratteristiche prestazionali del pannello**: sensibilità e specificità per ciascun patogeno variabili (VPN e VPP subordinati alla prevalenza)

Possibilità di un **trasporto asintomatico** di alcuni enteropatogeni, comune in alcune aree geografiche e in differenti tipologie di soggetti (bambini vs adulti vs anziani).

La decisione su **quale piattaforma commerciale utilizzare** può dipendere da una serie di fattori

- le prestazioni dei test
- il costo
- il flusso di lavoro
- il volume di produzione
- la popolazione di pazienti da testare

- Quali pannelli utilizzare ?
- Con quali modalità
- Quanto integrati e quanto sostitutivi
- Come interpretare i risultati
- Come refertare i risultati

# 50° CONGRESSO NAZIONALE AMCLI

Sessione 13

## GASTROENTERITI INFETTIVE
## REVISIONE DEL PERCORSO DIAGNOSTICO

# Proposta di revisione
# dei percorsi diagnostici delle enteriti infettive

# Percorso Diagnostico: Enteriti d'origine infettiva (Revisione- 2023)

a cura di:

- **Andreoni Stefano**
- **GLIVA** (Gruppo di Lavoro Infezioni Veicolate dagli Alimenti)
  (**Ambretti Simone, Besutti Valeria, Bracco Silvia, Fazii Paolo, Scavia Gaia**)

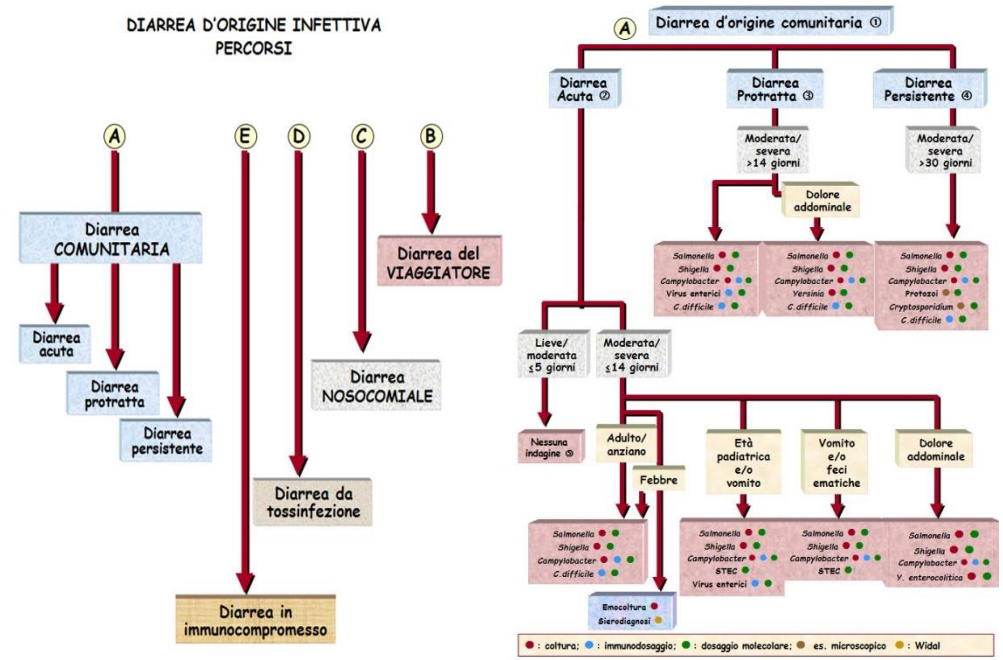
Indice

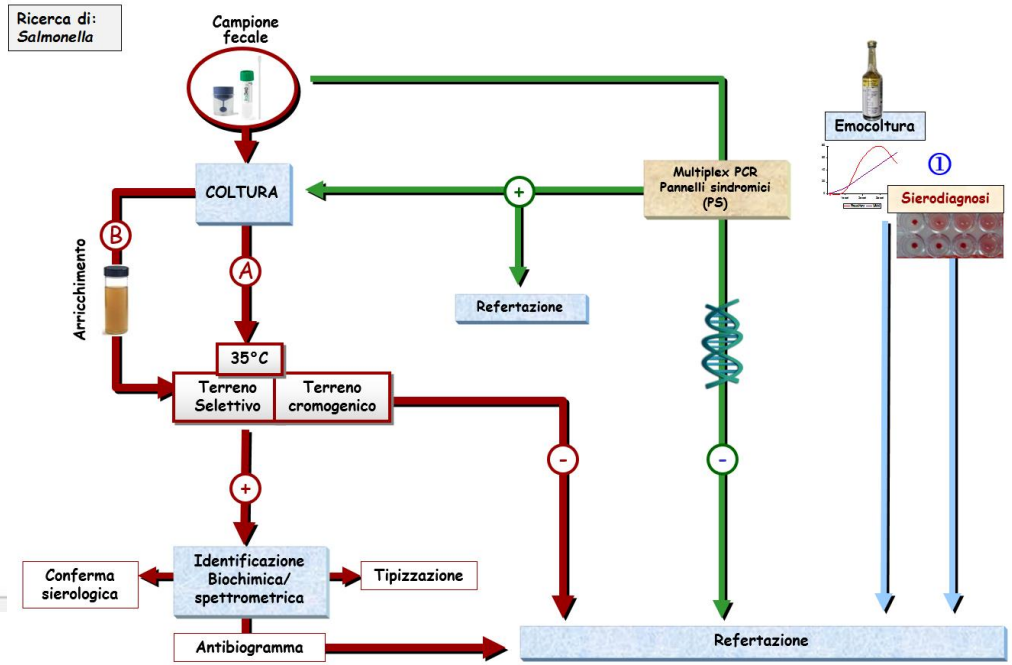

| | | |
|---|---|---|
| Generalità | | 1-2 |
| Definizioni | | 2 |
| Aspetti clinico-epidemiologici | | 2-3 |
| Segni - Sintomi | | 3 |
| Eziologia | | 3-4 |
| Aspetti patogenetici | | 4-5 |
| Approccio diagnostico | | 5 |
| | Esame microbiologico delle feci | 5-6 |
| | Materiali – Modalità di raccolta e trasporto | 6-7 |
| | Indagini- Esame microscopico/Leucociti fecali | 7 |
| | Indagini- Esame colturale - Modalità | 7-8 |
| | Indagini- Esame colturale - Isolamento | 8-9 |
| | Indagini- Esame colturale - Isolamento nel sospetto di tossinfezione | 9-10 |
| | Indagini- Esame colturale - Isolamento nel sospetto di diarrea da antibiotici | 10 |
| | Indagini-Emocoltura-Sierodiagnosi | 10 |
| | Indagini- Identificazione | 10-11 |
| | Indagini - Ricerca antigeni/tossine | 11-12 |
| | Indagini - saggi di citotossicità | 12 |
| | Indagini- sistemi molecolari | 12-15 |
| | Indagini - biosensori | 15 |
| | Algoritmi diagnostici | 15-16 |
| | Resistenze batteriche | 16-17 |
| Bibliografia essenziale | | 17-18 |
| Eziologia - Schede tecniche: Batteri associati ad infezioni intestinali | | 19-29 |
| Eziologia - Schede tecniche: Batteri associati a tossinfezioni alimentari | | 29-31 |
| Eziologia - Schede tecniche: Batteri associati a diarree nosocomiali | | 31-33 |
| Eziologia - Schede tecniche: Patogeni emergenti | | 33-34 |
| Eziologia - Schede tecniche: Enteriti virali | | 34-36 |

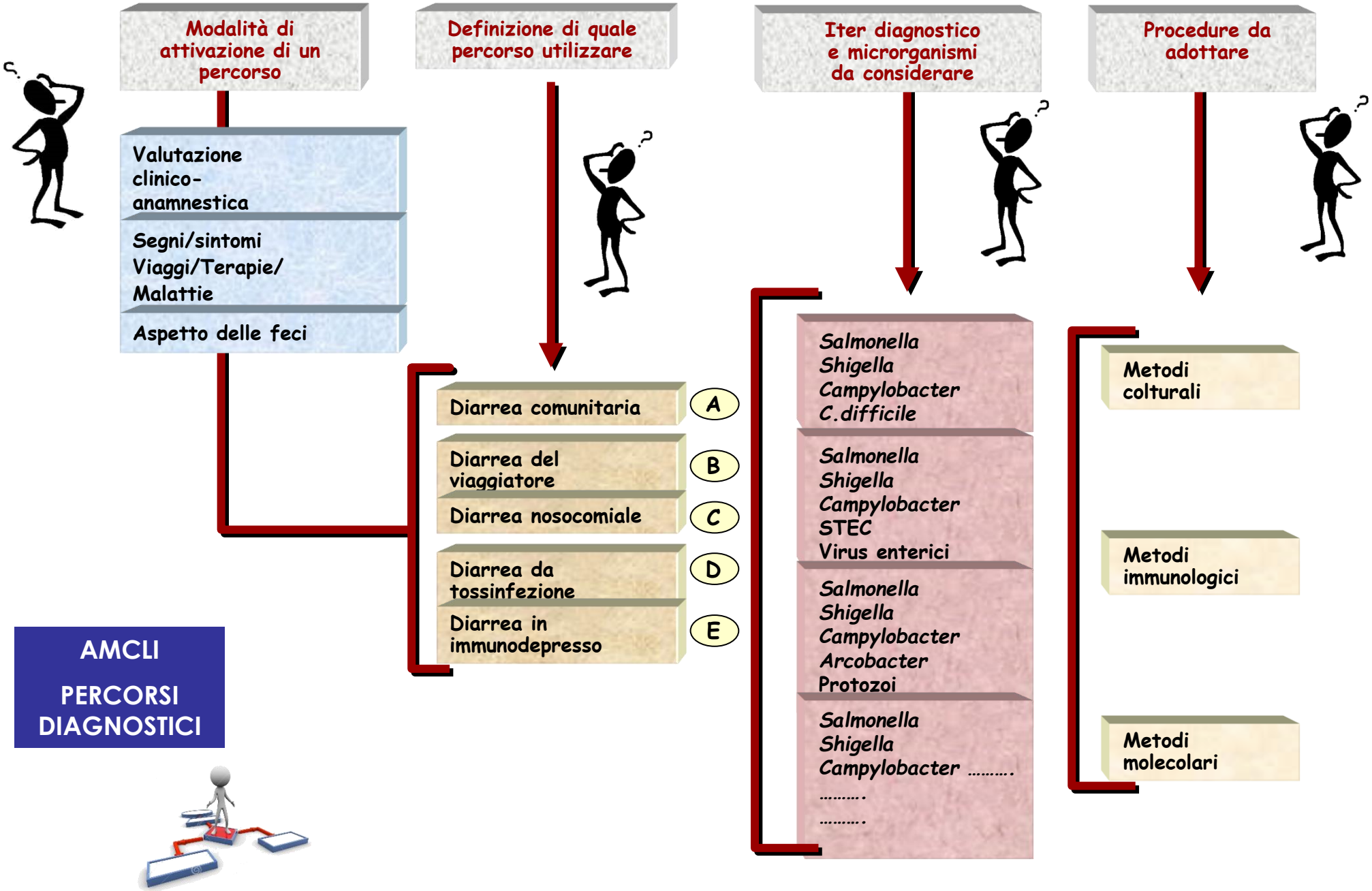

## Generalità.

Le malattie infettive d'origine alimentare rappresentano una delle cause più importanti di morbilità e mortalità nel mondo. La gastroenterite infettiva rappresenta infatti un problema sanitario mondiale con circa 2 miliardi di casi di diarrea che si verificano annualmente, causando oltre 2 milioni di decessi ogni anno. Le malattie diarroiche provocano 1 decesso infantile su 9 in tutto il mondo, rendendo la diarrea la seconda causa di morte tra i bambini di età inferiore ai 5 anni.

Il maggior carico di diarrea infettiva si verifica nei paesi a basso e medio reddito, in relazione all'approvvigionamento di acque non sicure, alle carenze nutrizionali e ai servizi igienico-sanitari inadeguati e scadenti. In questi paesi la diffusione di malattia diarroica nei bambini sotto i 5 anni è enorme, contribuendo alla malnutrizione che a sua volta accresce il rischio di diarrea infettiva, associandosi a ritardi nella crescita e nello sviluppo cognitivo. Nei paesi a basso reddito, i bambini di età inferiore ai tre anni sperimentano in media tre episodi di diarrea ogni anno. Ogni episodio priva il bambino del nutrimento necessario alla crescita. Di conseguenza, la diarrea è una delle principali




Modalità di attivazione di un percorso
Definizione di quale percorso utilizzare
Iter diagnostico e microrganismi da considerare
Procedure da adottare
Valutazione clinico-anamnestica
Segni/sintomi Viaggi/Terapie/ Malattie
Aspetto delle feci
Diarrea comunitaria
A
Diarrea del viaggiatore
B
Diarrea nosocomiale
C
Diarrea da tossinfezione
D
Diarrea in immunodepresso
E
Salmonella
Shigella
Campylobacter
C.difficile
Salmonella
Shigella
Campylobacter
STEC
Virus enterici
Salmonella
Shigella
Campylobacter
Arcobacter
Protozoi
Salmonella
Shigella
Campylobacter .....
.....
.....
Metodi colturali
Metodi immunologici
Metodi molecolari
AMCLI
PERCORSI DIAGNOSTICI

**AMCLI**

**PERCORSI DIAGNOSTICI**

**Modalità di attivazione di un percorso**

- Valutazione clinico-anamnestica
- Segni/sintomi
- Aspetto delle feci

**Definizione di quale percorso utilizzare**

- Diarrea comunitaria (A)
- Diarrea del viaggiatore (B)
- Diarrea nosocomiale (C)
- Diarrea da tossinfezione (D)
- Diarrea in immunodepresso (E)

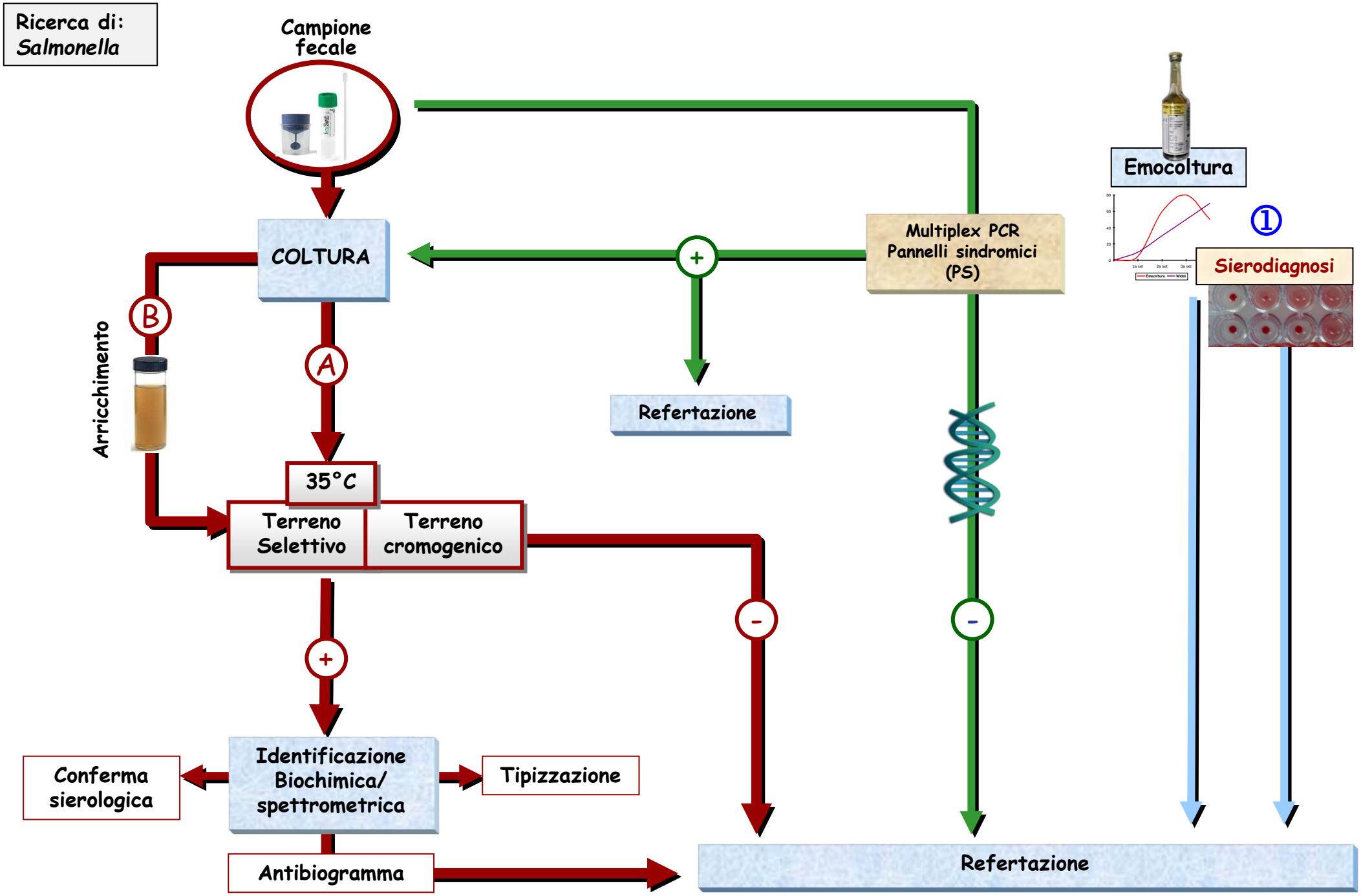
**Iter diagnostico e microrganismi da considerare**

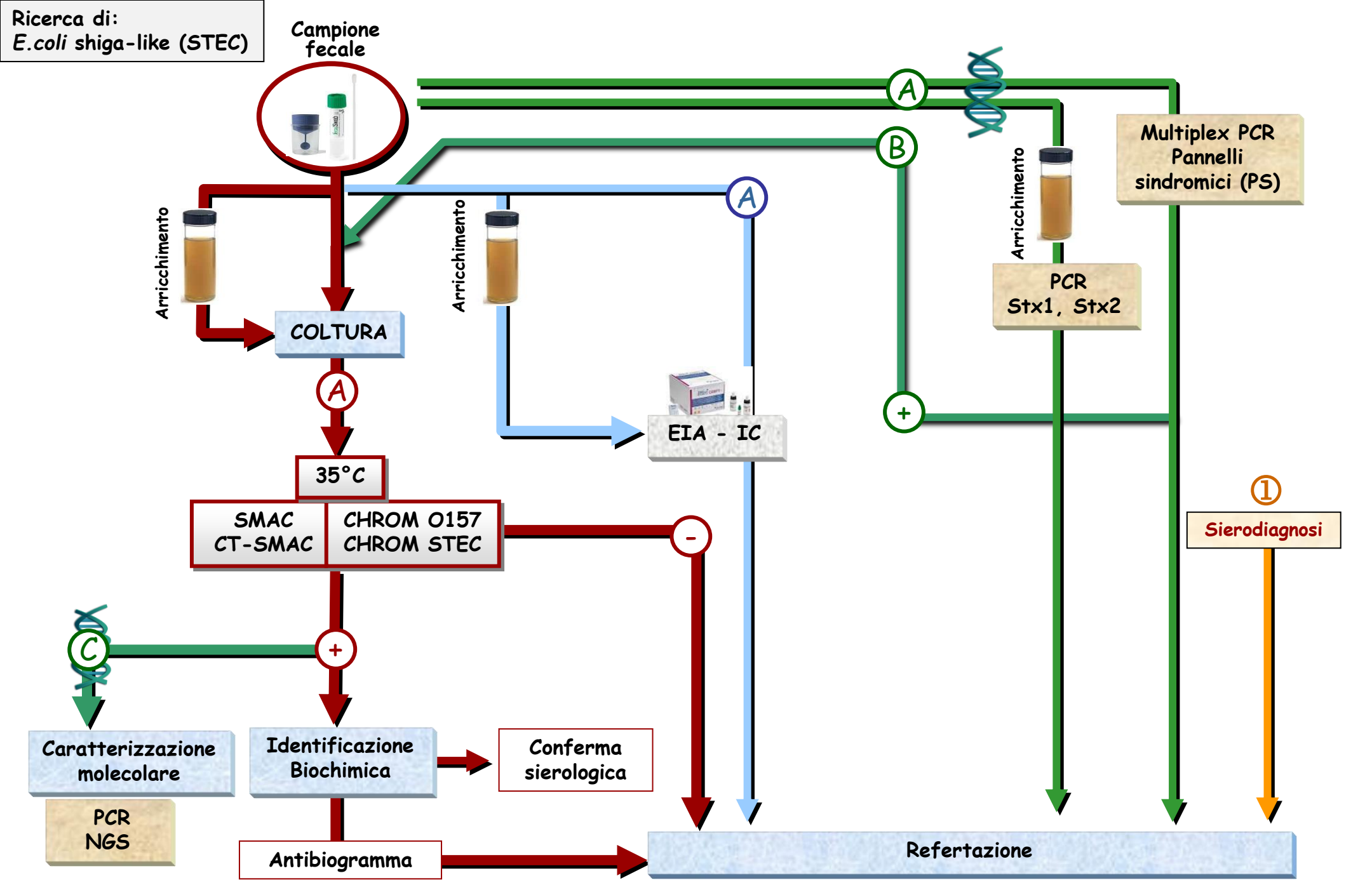
- *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *C.difficile*
- *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, STEC, Virus enterici
- *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Arcobacter*, Protozoi
- *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* ……. …….

**Procedure da adottare**

- Metodi colturali
- Metodi immunologici
- Metodi molecolari

**PANNELLI SINDROMICI**
**PANNELLI MULTIPLEX**


Ricerca di:
Salmonella
Campione fecale
COLTURA
B
A
Arricchimento
35°C
Terreno Selettivo
Terreno cromogenico
+
Identificazione Biochimica/ spettrometrica
Conferma sierologica
Tipizzazione
Antibiogramma
+
Refertazione
Multiplex PCR Pannelli sindromici (PS)
-
-
Emocoltura
1
Sierodiagnosi
Refertazione


Ricerca di:
E.coli shiga-like (STEC)
Campione fecale
Arricchimento
COLTURA
A
35°C
SMAC
CT-SMAC
CHROM O157
CHROM STEC
-
+
C
Caratterizzazione molecolare
PCR
NGS
Identificazione Biochimica
Conferma sierologica
Antibiogramma
Refertazione
A
Arricchimento
EIA - IC
B
+
Arricchimento
PCR
Stx1, Stx2
Multiplex PCR
Pannelli
sindromici (PS)
1
Sierodiagnosi

## COLTURA

(A) Essendo piuttosto problematico, l'esame colturale viene **indicato in campioni risultati positivi ad un test di screening molecolare** per la presenza dei geni *stx* codificanti per le Shiga-tossine
Semina diretta: alcune gocce di sospensione fecale vanno seminate su **terreni di coltura selettivi differenziali** e/o **cromogenici** [McConkey + sorbitolo (SMAC)] per l'isolamento di *E.coli* O157:H7; variante di McConkey + sorbitolo contenente cefixime e tellurito (CT-SMAC), per rilevare stipiti di *E.coli* O157sorbitolo-negativi; CHROMagar O157 che rileva il sierogruppo O157; CHROMagar STEC che rileva O157 e altri sei sierogruppi prevalenti (O26, O45, O103, O111, O121, O145).
Generalmente è preferibile un'incubazione in **brodo di arricchimento** (16-24 ore a 37°C) piuttosto che la semina diretta.

## Immunodosaggio (EIA,IC)

(A) La ridotta sensibilità e lo scarso valore predittivo negativo degli immunodosaggi per il rilevamento di antigeni di O157 ne limitano l'impiego diagnostico. Possono fornire viceversa un valido aiuto nella diagnosi di infezione da VTEC test immunoenzimatici, immunocromatografici per la ricerca nelle feci delle shiga tossine. I brodi di arricchimento risultati positivi per Sxt dovrebbero essere inviati ad un Centro di Sanità Pubblica per l'isolamento e la caratterizzazione.

## Dosaggio molecolare

(A) Sono sati sviluppati sistemi molecolari multiplex, così come pannelli sindromici (PS) in grado di rilevare geni *Shiga*-tossinici direttamente da campioni fecali o previo arricchimento in brodo. Questi sistemi potenzialmente molto sensibili possono garantire diagnosi rapide in grado di contribuire ad un approccio clinico-terapeutico più efficace e tempestivo soprattutto in situazioni a maggior rischio di complicanze (HUS).

(B) **L'orientamento attuale è quello di ricorrere alla dimostrazione diretta della presenza nelle feci dei geni *stx1* e *stx2* codificanti le Shiga tossine mediante test molecolari basati sulla real time PCR**. Per il rilevamento di *stx1* e *stx2* è auspicabile l'utilizzo di un brodo di arricchimento, tipicamente brodo GN, inoculato e incubato a 37°C per una notte.

(C) I principali STEC sierotipi vengono identificati mediante real time PCR per i sierogruppi più frequentemente associati all'infezione umana.

① I test sierologici sono diventati uno strumento diagnostico utile e affidabile per le infezioni da STEC, soprattutto quando manca l'isolamento batterico. L'anticorpo sierico anti-STEC LPS, che può persistere per diverse settimane, ha un valore per la diagnosi.

## CRITICITÀ: RELATIVE AI PS

- Impossibilità a distinguere tra i microrganismi vitali e non vitali o gli acidi nucleici residui, rilevabili anche per lunghi periodi di tempo dopo dell'infezione.

- Possibile presenza di patogeni in uno "status" asintomatico, sub-clinico, o di colonizzazione.

- Possibili difficoltà interpretative: particolari microrganismi (es: EPEC, sapovirus); coinfezioni.

- Impossibilità, in assenza di conferme colturali, di eseguire antibiogrammi, e/o sub-tipizzazioni.

- Difficoltà di valutazione di dati costo-efficacia, in termini di impatto sui costi di gestione di un paziente con diarrea.

# CONSIDERAZIONI - CONCLUSIONI

- Il **ruolo di *Consultant*** da parte del Microbiologo clinico diventa di fondamentale importanza nell'interpretazione del dato microbiologico.

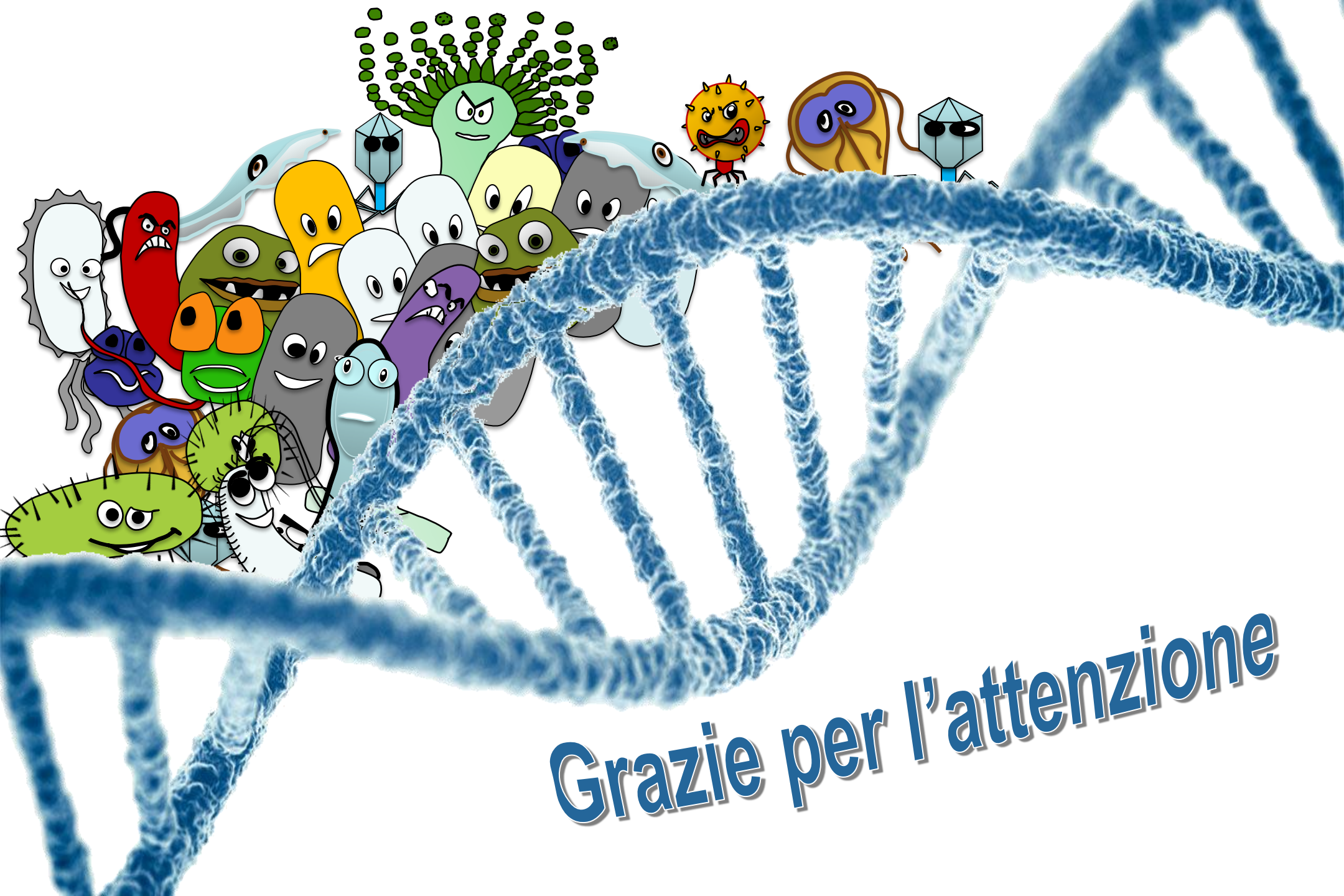
- Vi sono delle responsabilità per un utilizzo appropriato di questi sistemi (Microbiologo – Clinico) e andrebbero **stabilite regole** per il loro utilizzo.

- Ulteriori valutazioni e studi sono indispensabili per una corretta interpretazione dei risultati ottenuti con i pannelli Multiplex Real-time PCR nella diagnostica delle GI (**studi controllati randomizzati**).

- Andrebbero potenziati sistemi di monitoraggio nel rapporto costo-benefici (**Stewardship diagnostica e antimicrobica**).

- Molti sistemi informativi non sono stati progettati per la gestione di risultati delle piattaforme multiplex.

- La progettazione di **sistemi di reporting** integrati richiede un'attenta riflessione, in particolare per i test multiplex.


Grazie per l’attenzione