Studi COSP-AMCLI: l'importanza della fase pre-analitica e valutazione di un kit commerciale in multiplex RT-PCR

CoSP-AMClI
e A. Raglio

Medico Collaboratore Volontario
UOC Microbiologia e Virologia
ASST Papa Giovanni XXIII

Conflitti di interessi

Non ho ricevuto compensi da ditte

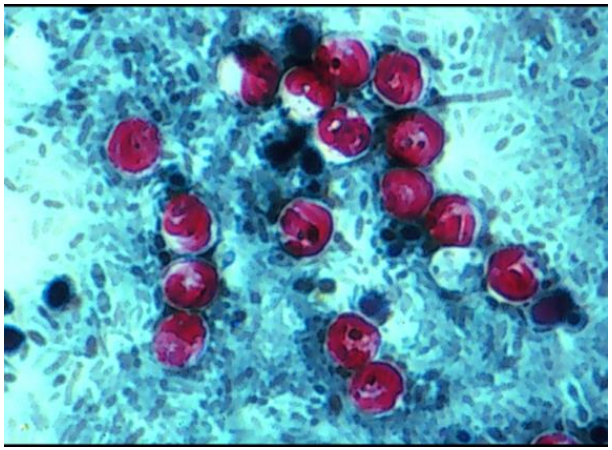
Alle ditte chiedo di sostenere le attività delle Associazioni Scientifiche

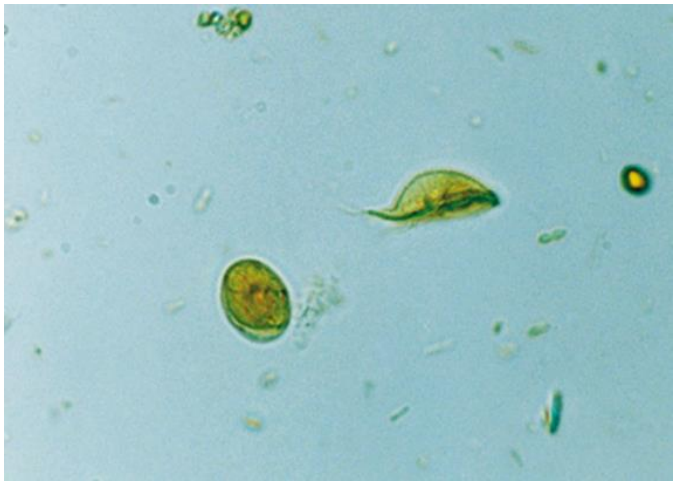
Argomenti

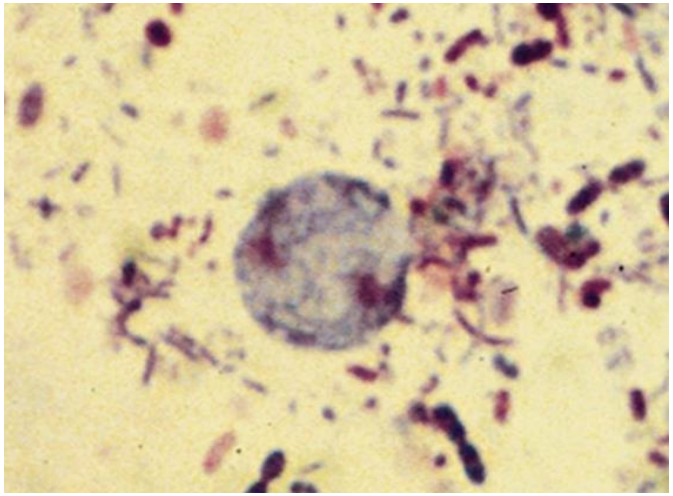
- Le difficoltà della diagnosi tradizionale
- L’evoluzione dal 2012
- Gli studi epidemiologici del CoSP AMClI
- Gli studi di valutazione dei test in commercio
- I Percorsi diagnostici
- Le difficoltà burocratiche

WHAT ARE YOU LOOKING AT?

Siamo tutti in grado di identificare questi protozoi?

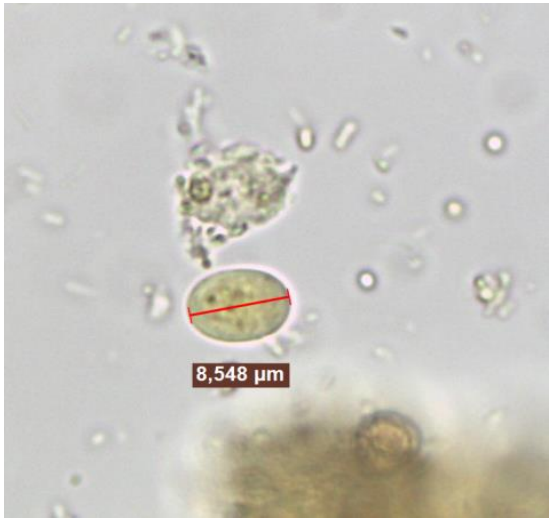






Programma VEQ: PARASSITOLOGIA
Ciclo 2015 Campione N° 7
Cisti di *Entamoeba hartmanni* e Cisti di *Endolimax nana*

Dimensioni: mediamente 6-8 µm con un range da 5 a 10 µm.
Nuclei: da 1 a 4; le cisti con 1-2 nuclei sono le più comuni.
La freccia indica un secondo nucleo posto su un diverso piano focale.
Le cisti di *E. hartmanni* sono morfologicamente molto simili a quelle di *E.histolytica/dispar*, possono essere distinte in base alle dimensioni che in *E. histolytica/dispar* sono mediamente di 12-15 µm.



Dimensioni: mediamente 6-8 µm con un range da 5 a 10 µm.
Nuclei: nelle cisti mature sono 4. Il cariosoma è grande e ben visibile; la cromatina periferica è assente.
Nell'immagine a sinistra sono visibili 3 nuclei. La freccia indica un lievito.

Le fotografie sono state eseguite da una sospensione fecale contrassegnata "Campione N° 07, Exp. Date: 26/05/2016"

Risultato atteso:
Cisti di *Entamoeba hartmanni* e Cisti di *Endolimax nana*

Parassita refertato	Nr	%
Endolimax nana + *Entamoeba hartmanni*	0	0,0%
Endolimax nana	155	75,2%
Endolimax nana + un parassita inatteso	1	0,5%
Entamoeba hartmanni	8	3,9%
Entamoeba histolytica/dispar	10	4,9%
Entamoeba coli	3	1,5%
Entamoeba spp	4	1,9%
Amebe non identificate	1	0,5%
In parassita inatteso	19	9,2%
Assenza di parassiti	5	2,4%
Totale	206	100,0%

Parassiti inattesi

Giardia duodenalis (8); *Blastocystis hominis* (3); *Cyclospora cayetanensis* (2); *Enteromonas hominis* (1); Microsporidi (1); *Ascaris lumbricoides* (3); *Strongyloides stercoralis*(2).

Nessun laboratorio ha refertato *Endolimax nana* + *Entamoeba harmanni*. Su 206 laboratori 155 (75,2%) hanno identificato solamente *E. nana*. Sono stati 25 (12,1%) i laboratori che hanno refertato per *Entamoeba*, ma di questi solo 8 (3,9%) hanno correttamente identificato *E. hartmanni*, mentre 10 laboratori hanno refertato *Entamoeba histolytica/dispar.*

Indagini eseguite per l'O&P in 29 laboratori

Indagine CoSP-AMCll 2016

	FEA #	Col.ne ^ estemporanea	Col.ne ° permanente	Ric. * antigenica	Schede cedolini
SI	29 #	19 ^	18 °	20 *	10
Non sempre/talora		-	-		15
NO/non riferito	-	10	11	9	4

Note:
1 caso: Ritchie; 2 casi: Spincon Meridian; 27 casi: non riportato
^ Lugol: 17 laboratori (1 anche con cabolfuscina); Dobell: 2 laboratori (1 anche con blu di metilene);
° 18 Giemsa (1 anche con tricromica); 1 tricromica
* varie: immunocromatografiche/IF/ELISA

Risultati finali complessivi 2: esame O&P
(esame coproparassitologico standard)

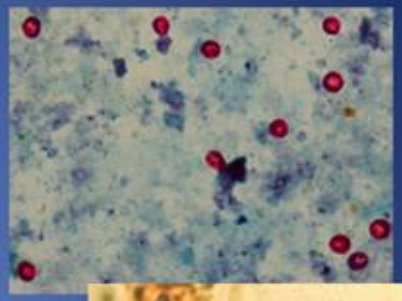
Su 37000 pazienti di 8 centri più 22000 campioni di un centro

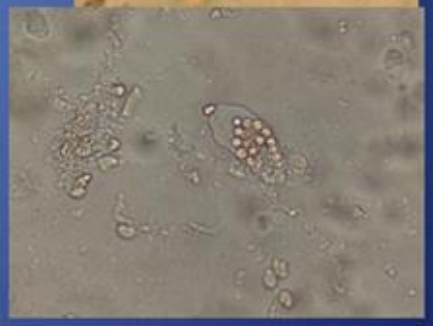
N° soggetti con patogeni	con ELMINTI ^ patogeni	con PROTOZOI ° patogeni	Associazioni varie *
1828 3.2 %	407 0.7 %	1432 2.5 %	676 / 4268 15.8 %
[100 %]	22.3 %	77.7 %	

Note:
* soggetti con 2 o più parassiti, patogeni e/ non patogeni (tra PP, tra PP e PNP o tra PNP)
^ rare associazioni tra elminti patogeni
° alcune associazioni tra protozoi patogeni

Faecal Parasitology PCR - Where we are now?

- Real –time multiplex protozoal PCR went live in March 2012
- Parasites involved are *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*.
- Performed weekly
- Between 30 - 60 Stool samples per run
- Takes 48 hours to run and validate





Results from Microscopy OCP vs PCR

	Giardia	*E. histolytica*	*Cryptosporidium*
PCR Positive from Total samples	67 (3.7%)	11 (0.6%)	9 (1.4%)
PCR Positive Microscopy Positive (Total)	24 (1.4%)	5 (0.3%)	8 (1.3%)
PCR Positive Microscopy Negative (Total)	43 (2.4%)	6 (0.4%)	1 (0.2%)

1788 OCP, 625 ZN were performed

Impact of transition from microscopy to molecular screening for detection of intestinal protozoa in Dutch patients

S. Svraka-Latifovic, S. Bouter, H. Naus, L. J. Bakker, C. P. Timmerman and J. W. Dorigo-Zetsma
Central Bacteriology and Serology Laboratory, Tergooi, Hilversum, the Netherlands

In conclusion, introduction of the parasite PCR resulted in higher sensitivity, reduced hands-on-time and time-to-results, leading to improved diagnostic efficiency.
We recommend the introduction of parasite PCR into routine parasitological practice.
This will facilitate larger-scale studies on the prevalence and clinical characteristics of protozoal gastrointestinal infections.

Editor: D. Raoult
Article published online: 16 February 2014
Clin Microbiol Infect

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 van Vugt**

Section Clinical Parasitology, Dept. Medical Microbiology, AMC,
*Regional laboratory, Kennermerland, Haarlem, ** Dept. Infectious Diseases, AMC

ESCMID Online Lecture Library
© by author

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
	Entamoeba polecki		Mijnworm
			Strongyloides srecoralis
			Trichuris trichiura
			Diphyllobothrium latum
			Hymenolepis diminuta
			Hymenolepis nana
			Taenia spp.

Routine diagnosis with microscopy (Ridley)

PCR: First line diagnosis PCR, when positive confirmation with microscopy.

© by author

Sensitivity of the DFT

Sensitivity for five intestinal protozoa					
				DFT	
Parasites	number of patients examined	Number positives with Gold standard: (TFT and/or PCR pos)	prevalence	number of positives	% pos
Blastocystis spp	277	61	22,0%	56	91,8
D.fragilis	277	57	20,6%	55	96,5
Giardia lamblia	2275	76	3,3%	75	98,7
E.histolytica	2275	9	0,4%	9	100,0
Cryptosporidium	2275	6	0,3%	6	100,0

Sensitivity of DFT for 4/5 infections 97-100%

ESCMID Online Lecture Library
© by author

Controlli *LEISHMANIA CHAGASI* DNA, (Amplirun), Alifax
PCR *Leishmania* spp., (Clonit), ELITechGroup
RT PCR Viscerale e Cutanea, LCM GENECT

43.11 Malaria

43.11.1 Ricerca Antigeni

ICT BinaxNOW, Abbott
ICT PF/PV/PAN, Alifax
ICT MBPAN, Biolife Italiana Mascia Brunelli
ICT Pf/Pv, Dasit
ICT OptiMAL-IT (Bio-Rad), DID
ICT CareStart™ Malaria Rapydtest® (Apacor), DID
ICT Pan/PV/PF (Paramax), EffeGiEmme
ICT Ag Card, Nuclear Laser Medecine

43.11.2 Sierodiagnosi

EIA MALARIA AB, Alifax
EIA Malaria Assay, Bio-RAD
EIA Palutop+4 (OPTIMA), DASIT
ELISA Ab (DIAPRO), EffeGiEmme
ELISA, Golden Standard Diagnostics
ELISA, EUROIMMUN
EIA, Nuclear Laser Medecine

43.11.3 Biologia Molecolare

PCR RealStar Malaria Screen & Type, Altona
PCR *Plasmodium* spp., *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, Becton Dickinson
PCR Malaria Panel, ELITechGroup
PCR Malaria Screening, ELITechGroup
RT PCR Malaria Speciazione 5 specie, LCM GENECT
LAMP Malaria, (Alethia), Meridian

43.12 Parassitosi intestinali

43.12.1 Biologia molecolare

PCR, Protozoi, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Cyclospora cayetanensis*, (Seegene) Arrow
PCR, Elminti e Microsporidi, *Ancylostoma* spp., *Ascaris* spp., *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis* spp., *Necator americanus*, *Strongyloides* spp., *Taenia* spp., *Trichuris trichiura*, *Enterocytozoon* spp. /*Encephalitozoon* spp, (Seegene) Arrow
PCR, Protozoi, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum* & *hominis*, Becton Dickinson
Microarray; Protozoi e Elminti, (NovoDiag), Hologic
FilmArray, Protozoi, BioMerieux
PCR, *Cryptosporidium* spp., *G. lamblia* e *E. histolytica*, Viasure, ELITechGroup
PCR *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *Dientamoeba fragilis* e *Blatocystis hominis*, LCM GENECT
PCR *Giardia lamblia* - *Cryptosporidium* (*parvum* e *hominis*) - *Dientamoeba fragilis* - *Entamoeba histolytica* (no dispar) - *Blastocystis hominis* tipo 1 e tipo 3 - *Cyclospora cayetanensis*, NuclearLaser
FilmArrey, Protozoi, Qiagen
PCR *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. e *Dientamoeba fragilis*, R-Biopharm
PCR *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium* spp, R-Biopharm
PCR *D. fragilis*, R-Biopharm
PCR Protozoi, Roche

43.13 Schistosomiasi

43.13.1 Sierodiagnosi

EIA *Schistosoma mansoni* IgG, Alifax
Wb IgG, LDBIO, EffeGiEmme
ELISA *Schistosoma mansoni*, Bordier, EffeGiEmme
ICT *Schistosoma* ab, EffeGiEmme
ELISA, EUROIMMUN
ELISA *Schistosoma mansoni* IgG e IgM, Golden Standard Diagnostics
IFA *Schistosoma mansoni*, Nuclear Laser Medecine
EIA *Schistosoma mansoni*, Nuclear Laser Medecine
EIA IgG, Technogenetics
IHA IgG, Technogenetics

43.14 Strongiloidiasi

43.14.1 Sierodiagnosi

ELISA *Strongyloides*, Bordier, EffeGiEmme
EIA IgG, NovaTec, Alifax e Technogenetics
ELISA, EUROIMMUN

43.15 Toxocariasi

43.15.1 Sierodiagnosi

EIA *Toxocara canis* IgG, Alifax
Immunoblot - BLOT TOXOCARA IgG, Alifax
WB IgG – LDBIO, EffeGiEmme
ELISA IgG Bordier, EffeGiEmme
ELISA, EUROIMMUN
ELISA *Toxocara canis* IgG, Golden Standard Diagnostics
IgG/IgM EIA, Nuclear Laser Medecine
EIA IgG, Technogenetics

Elenco test in commercio in Italia 2023
Nuovo De Carneri
Pozio, Bruschi

MA
Conosciamo la loro sensibilità e specificità?

SCOPO DELLO STUDIO PCR Protozoi

Valutare i vantaggi del metodo molecolare Seegene Inc. in comparazione con i metodi convenzionali di diagnosi:

microscopia diretta dopo concentrazione

microscopia dopo colorazione estemporanea e/o permanente

microscopia dopo esame colturale

ricerca di antigeni tramite immunocromatografia o altro saggio immunologico.

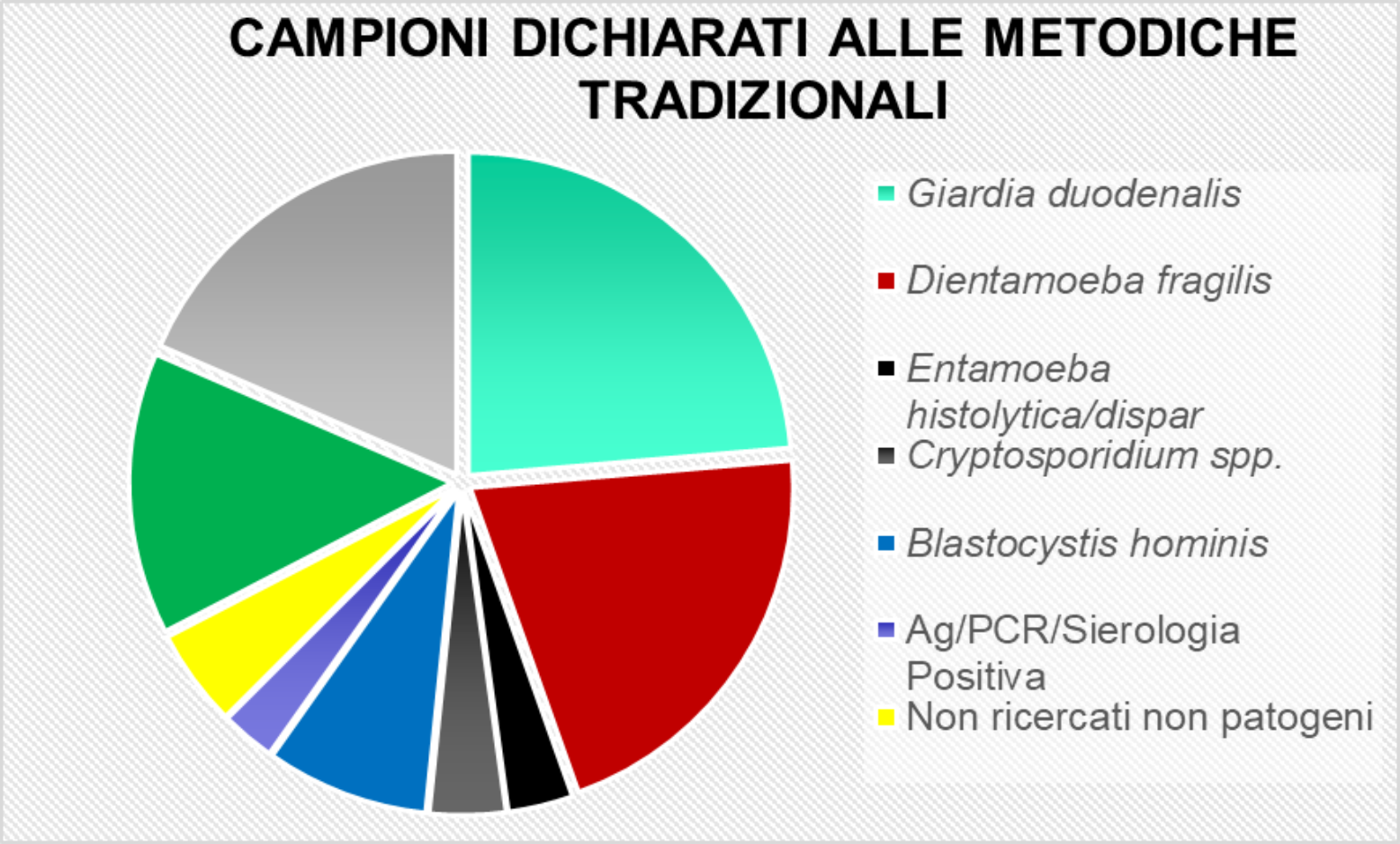
2019/2020

Studio multicentrico CoSP AMCLI

UOC Microbiologia e Virologia, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

Parere favorevole CE Bergamo

Laboratorio	N° Campioni
BERGAMO ASST Papa Giovanni XXIII	138
BOLOGNA Azienda Ospedaliero Universitaria Sant'Orsola	107
NAPOLI Azienda Ospedaliera dei Colli	9
TREVISO ULSS2 Marca Trevigiana	34
MODENA Ospedale Civile AUSL	20
LECCO ASST Lecco	2
LEGNANO ASST Ovest milanese	9
PINEROLO ASLTO3 SC Laboratorio Analisi Unificato Rivoli-Pinerolo	2
PAVIA IRCCS Policlinico San Matteo	25
BRUNICO Azienda Sanitaria dell'Alto Adige	5
ANCONA Laboratorio Beta di Osimo	5
VERONA AOUI Verona	12
TOTALE	**368**


CAMPIONI DICHIARATI ALLE METODICHE TRADIZIONALI
Giardia duodenalis
Dientamoeba fragilis
Entamoeba histolytica/dispar
Cryptosporidium spp.
Blastocystis hominis
Ag/PCR/Sierologia Positiva
Non ricercati non patogeni

MATERIALI E METODI

Approvazione Comitato Etico, ASST Papa Giovanni XXIII, Bg

Campioni residui anonimizzati di pazienti risultati positivi all'esame parassitologico (consegnati a fresco o congelati a -20/-80 °C).

Risospendere 50 a 100 mg di campioni di feci in 1 mL di tampone di lisi.

Vortexare i campioni per 1 minuto e incubare a temperatura ambiente per 10 minuti, centrifugare le provette a 14.000 rpm per 2 minuti.

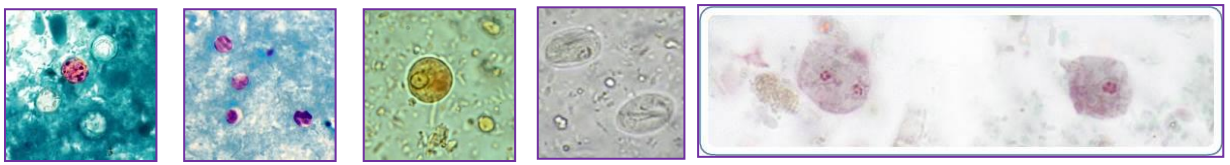
Il DNA è stato estratto utilizzando il sistema Microlab Nimbus IVD (Hamilton, Reno, Nevada).
Il sistema Microlab Nimbus IVD esegue estrazione e PCR setup.

MATERIALI E METODI

Gli estratti di DNA sono stati amplificati con One-step Real Time - PCR multiplex utilizzando il pannello Allplex ™ GI-Parasite Assay (Seegene Inc., Seoul, Korea).

***Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis* e *Cyclospora cayetanensis*.**

Una volta eseguite le analisi sono stati inviati i risultati ai laboratori partecipanti segnalando incongruenze o le possibili note scaturite dalla comparazione dei due esami. In pochi casi è stato necessario eseguire altri test bio-molecolari per tentare di definire il vero risultato.



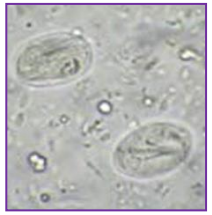
OOcisti di C. cayetanensis e *Cryptosporidium* spp colorazione alcool acido resistente, Cisti di *Entamoeba histolytica*, colorazione di Lugol, Cisti di *Giardia duodenalis*,, Trofozoita di *Dientamoeba fragilis*, colorazione tricromica (CDC)

Giardia duodenalis

Risultati laboratorio inviante prima interpretazione	N°	PCR in valutazione				
		VP	VN	FN	FP	
Giardia duodenalis	87	87				
G. duodenalis / *B. hominis*	8	8				
G. duodenalis / *E. coli*	1	1				
G. duodenalis / *E. histolytica dispar*	1	1				
G. duodenalis/ *D. fragilis*	1	1				
D. fragilis/ ***G. duodenalis*** / *B. hominis*	1	1				
G. duodenalis / *Cryptosporidium spp.*	1		1			Confermato dal lab. inviante
G. duodenalis / *E. nana*	1	1				
G. duodenalis / *E. histolytica dispar* / *E. coli*	2	1	1			Confermato da altre RT PCR
E. histolytica dispar	11		10		1	Confermato negativo da altre RT PCR
Microscopia negativa (RT PCR -Ag positivi)	3	3				
B. hominis / *E. coli*	6	1+	5			
B. hominis	30		29		1	Ripetuto ma negativo
		Met. tradizionale				**RT PCR**
			104			104+1

VP: vero positivo VN: vero negativo FP: falso positivo FN: falso negativo

Giardia duodenalis: sensibilità e specificità



RT-PCR

RT-PCR	VP	VN	tot
+	105	2	107
-	0	261	261
tot	105	263	368

	+	-	FP	FN
Giardia duodenalis	105	261	2	0

SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
100%	99,2%

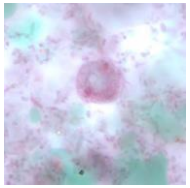
Metodo tradizionale

TRADIZIONALE	VP	VN	tot
+	104	2	106
-	1	261	262
tot	105	263	368

	+	-	FP	FN
Giardia duodenalis	104	261	2	1

SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
99%	99,2%

Dientamoeba fragilis



Risultati laboratorio inviante prima interpretazione	N°	PCR in valutazione		
		VP	FN	VN
Dientamoeba fragilis	77	54	3*	20
D. fragilis / *B. hominis*	16	9		7
D. fragilis / *G. duodenalis*	1			1
D. fragilis/ *G. duodenalis* / *B. hominis*	1			1
D. fragilis / *E. nana*	1			1
B. hominis / *E. coli* / *E. nana*	3	1 +		2
Giardia duodenalis	87	5 +		82
Cryptosporidium spp.	14	1 +		13
B. hominis	30	11 +		19
Entamoeba histolytica /dispar	12	2 +		10
Non ricercate non patogene	18	4 +		14
Microscopia negativa (RT PCR positiva)	2	1		1
Campioni con microscopia negativa	68	17 +		51
Negativo (con Ig per *E. histolytica*)	2	1 +		1

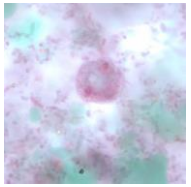
15 *B. hominis*

*Campioni confermati positivi da altre RT-PCR e dalla revisione dei vetrini

Met. tradizionale	RT PCR
64	64+42

VP: vero positivo VN: vero negativo FP: falso positivo FN: falso negativo

Dientamoeba fragilis: Sensibilità e specificità



RT-PCR

RT-PCR	VP	VN	tot
+	106	0	106
-	3	259	262
tot	108	259	368

D. fragilis	+	-	FP	FN
	106	259	0	3

SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
97,2 %	100 %

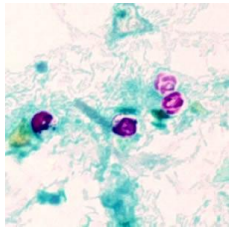
Metodo tradizionale

TRADIZIONALE	VP	VN	tot
+	67	31	98
-	42	228	270
tot	109	259	368

D. fragilis	+	-	FP	FN
	67	228	31	42

SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
61,4 %	88 %

Cryptosporidium spp.



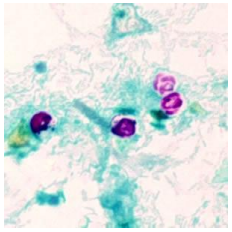
Risultati laboratorio inviante prima interpretazione	N°	PCR in valutazione			
		VP	VN	FP	FN
Cryptosporidium spp.	14	12	2		
G. duodenalis / ***Cryptosporidium spp.***	1		1		
Microscopia negativa (Ag positivo)	1	1			
B. hominis	30	1 +	29		
Protozoi non ricercati non patogeni	18		17	1	←

Campione testato una seconda volta risultato negativo. (Interferenza all'interno del pozzetto nella piastra di amplificazione? 9 Ct)

Met. tradizionale	RT PCR
13	13+1

VP: vero positivo VN: vero negativo FP: falso positivo FN: falso negativo

Cryptosporidium spp.: sensibilità e specificità



RT-PCR

RT-PCR	VP	VN	tot
+	14	1	15
-	0	353	353
tot	14	354	368

Cryptosporidium spp.	+	-	FP	FN
	14	353	1	0

SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
100%	99,7%

Metodo tradizionale

TRADIZIONALE	VP	VN	tot
+	13	3	14
-	1	351	352
tot	14	354	368

Cryptosporidium spp.	+	-	FP	FN
	13	351	3	1

SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
92,8%	99,1%

Entamoeba histolytica

Risultati laboratorio inviante prima interpretazione	N°	PCR in valutazione	
		VP	VN
Entamoeba histolytica /dispar	12	1	11
G. duodenalis / ***E. histolytica dispar*** / *E. coli*	2		2
E. histolytica dispar / *E. nana* / *B. hominis*	2		2
E. hystolitica dispar / *E. hartmanni*	1		1
E. histolytica dispar / *E. nana*	2	**1**	1
E. histolytica dispar / *E. nana* / *E. coli*	1	**1**	
B. hominis / *E. coli* (Ag *E. histolytica* / *dispar* pos)	2	**1**	1
Microscopia negativa (Ag *E. histolytica* / *dispar* pos, Ab pos)	4	**3**	1
B. hominis / *E. coli* / *E. nana* / *Chilomastix* (Ag *E. histolytica* / *dispar* pos)	1		1
B. hominis	30	**1 +**	29

2 campioni con Ag negativo, sierologia positiva

Ag negativo Sierologia positiva

Met. tradizionale	RT PCR
4	4+**1 (+3)**

VP: vero positivo VN: vero negativo FP: falso positivo FN: falso negativo

Entamoeba histolytica: sensibilità e specificità

RT-PCR

		VP	VN	tot
RT-PCR	+	8	0	8
	-	0	360	360
	tot	8	354	368

Entamoeba histolytica	VP	VN	FP	FN
	8	360	0	0

SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
100%	100%

Metodo tradizionale

		VP	VN	tot
TRADIZIONALE	+	7	20	27
	-	1	340	341
	tot	8	360	368

Entamoeba histolytica	VP	VN	FP	FN
	7	340	20 *E.dispar*	1

SENSIBILITA'	SPECIFICITA'
87,5%	94,4%

	SENSIBILITA'		SPECIFICITA'	
	Met. tradizionale	RT-PCR in analisi	Met. tradizionale	RT-PCR in analisi
Giardia duodenalis	99 %	100 %	99,2 %	99,2 %
Dientamoeba fragilis	61,4 %	97,2 %	88 %	100 %
Cryptosporidium spp.	92,8 %	100 %	99,1 %	99,7 %
Entamoeba histolytica	87,5 %	100 %	94,4%	100 %

	Positività aggiunte	FP	FN
Giardia duodenalis	**1**	2	0
Dientamoeba fragilis	**42**	0	3
***Cryptosporidium* spp.**	**1**	1	0
Entamoeba histolytica	**1(+3)**	0	0

Il protozoo identificato maggiormente con RT PCR è stato *D. fragilis* che, spesso, è stato scambiato per *B. hominis* e viceversa, è quindi utile nel pannello avere *B. hominis* per confermare il risultato.

Rapida e accurata identificazione di *E. histolytica,* permettendo la discriminazione tra le due amebe patogena e non patogena.

SCOPO DELLO STUDIO PCR Elminti

Valutare i vantaggi del metodo molecolare kit Allplex GI-Helmint Assay-Seegene, che rileva *A.lumbricoides* (AI), Ancilostomidi (A/N), *S. stercoralis* Ss, *Taenia* spp (TA), *Hymenolepis* spp (Hy), *T. trichiura* (Tt) e *E. vermicularis* (Ev), in comparazione con i metodi convenzionali di diagnosi:

esame macro- e microscopico dopo concentrazione,

coltura per *Strongyloides stercoralis* (*Ss*)

e sierologia per *Ss* e *Schistosoma* spp

2022/2023

Studio multicentrico CoSP AMCLI

UOC Microbiologia e Virologia, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

Parere favorevole CE Bergamo

N.F.J. Schillaci, M. Cuntrò, C. Farina ASST-Papa Giovanni XXIII, Bergamo
E. Oliva, AUSL -IRCCS Santa Maria Nuova, Reggio Emilia
L. Clemente, ASUGI, Monfalcone
S. Varani Policlinico Sant'Orsola - Malpighi, Bologna
N. Menegotto ULSS 2 MarcaTrevigiana, Treviso
V. Besutti Azienda Ospedaliera Universitaria, Padova
A. Bruno IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia
L. Petrullo AORN Ospedale dei Colli, Napoli,
A. Raglio

Gdl CoSP-AMCLI

Ulteriori referenti partecipanti allo studio:

D.Oggioni , Brianza - Ospedale di Vimercate;

A. Carducci ,ASST Valle-Olona - Presidio ospedaliero di Busto Arsizio;

C. Ghia, Osp. Fatebenefratelli - Sacra Famiglia di Erba;

P. Mirri, Ospedale di Legnano.

diagnostics

MDPI

Article

Comparative Study of DNA Extraction Methods for the PCR Detection of Intestinal Parasites in Human Stool Samples

Siriporn Srirungruang [1,2], Buraya Mahajindawong [1,3], Panachai Nimitpanya [1,4], Uthaitip Bunkasem [1,5], Pattama Ayuyoe [1,2], Surang Nuchprayoon [1,5] and Vivornpun Sanprasert [1,5,*]

In recent decades, molecular diagnostic methods have been prioritized.

However, there are several reports that show false negative results from PCR, even when using DNA extracted from positive samples via microscopy [4–6].

These results might be caused by the strong eggshells and the hard and sticky cuticles of the helminths, debris, and fibers in the stool samples.

Not only DNA inhibitors but also various PCR inhibitors have been found in stool samples [7].

Therefore, DNA extraction methods are crucial to extract a sufficient quantity and quality of genetic materials from stool samples, especially when various types of organism species need to be detected.

Diagnostics 2022, 12, 2588. https://doi.org/ 10.3390/diagnostics12112588

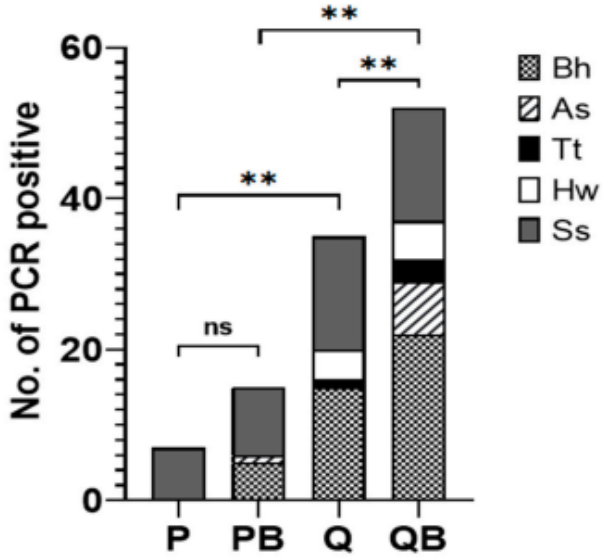


Figure 7. Comparison of the DNA extraction methods for the detection of intestinal parasites. Bh: *Blastocystis* sp., As: *Ascaris lumbricoides*, Tt: *Trichuris trichiura*, Hw: hookworm, Ss: *Strongyloides stercoralis*. ** Statistical differences using chi-square test ($p < 0.01$), ns: non-significant differences ($p > 0.05$).

QIAamp Power Fecal Pro DNA Kit (QB) focused on the bead-beating pretreatment

The QB method is a highly efficient DNA extraction method, not only for the molecular diagnosis of intestinal parasites but also for epidemiological study

Diagnostics 2022, 12, 2588. https://doi.org/ 10.3390/diagnostics12112588

MATERIALI E METODI

Sono stati raccolti 181 campioni da 15 ospedali italiani.

Sono stati esaminati con le tecniche tradizionali

- Testate diverse metodiche di estrazione, con o senza lisi meccanica (35", 7000rpm in MagnaLyser - protocollo suggerito da Gagneaux et al. 2020 – Parasite)

- Liquido di risospensione feci: Roche Lysis/Binding Buffer, Copan Fecal Swab, STARMag lysis buffer

Pretrattamento
(tutti estratti con **STARMag** post lisi meccanica)

- Fecal swab
- Fecal swab centrifugato
- Feci in lysis buffer Roche + MagnaLyser
- Feci in lysis buffer Seegene + MagnaLyser
- Feci in Fecal swab + Magnalyser

Prove iniziali
Preparazione e lisi

Risultati

- Roche Lysis/binding buffer **inibisce** la PCR
- Prestazioni simili tra COPAN Fecal swab e STARMag lysis buffer CON pretrattamento MagnaLyser
- Lisi con Magnalyser aumenta la sensibilità rispetto ad estrazione senza lisi meccanica (2-3 Ct guadagnati)

PROBLEMA

Roche ha dismesso Magnalyser

Lisi meccanica con altro metodo

Setup studio

Campioni processati in triplicato:

- Copan FECAL Swab + Magnalyser 35” (e lisi STARMag)
- Feci risospese in Buffer Universal Starmag + Magnalyser 35” (e lisi STARMag)
- Feci in buffer **ASL Qiagen** + Magnalyser 35” (e lisi STARMag)

Risultati

- Utilizzo di lisi meccanica migliora la resa
- Testati differenti buffer, buffer ASL migliora le performance

Protocollo lisi Elminti con buffer ASL

- Aggiungere 600uL di buffer ASL (codice Qiagen 19082) nelle provette MagNA Lyser Green Beads (codice Roche 033589410011)
- Prelevare circa 160mg di feci con un'ansa sterile rigida, cercando di recuperare materiale da più punti diversi del campione (circa due/tre ansate piene). Stemperare nel buffer ASL
- Caricare le provette con biglie sullo strumento MagNA Lyser (codice Roche 03358976001) e lisare per 35'' al massimo della velocità (7000rpm)
- Centrifugare le provette 10' a 2000g
- Prelevare 400uL di surnatante e trasferire in una nuova provetta da 1.5mL
- Caricare su Nimbus/STARLet e far partire il protocollo OneStep per Elminti.

Estrazione

Amplificazione

Risultati in fase di conferma

Sui 181 campioni arruolati, le indagini tradizionali hanno identificato:

5 campioni negativi,

19 elminti non previsti dal pannello (10 *Schistosoma mansoni*, 5 *Bothriocephalus latus, 3 S. haematobium e 1 Dicrocelium dentriticum*);

15 *Al*; 1 Al+Tt

11 Ancilostomidi;

61 *Ev*;

39 *Ss*; 2 solo in coltura per *Ss* e 1 solo con sierologia positiva per Ss,

26 *Taenia* spp;

5 *Hn*

Risultati RT-PCR su 181 campioni

In corso conferma dei discordanti

Specie	**VP**	**FN**	**Sensibilità %**	**Specificità %**
Ancilostomidi	10	1	91	100
A. lumbricoides	5	10	33	100
E. vermicularis	31	30	50	100
S. stercoralis	24	14	63	100
Taenia spp	24	2	92	100
H. nana	5	0		
T. trichiura	1	0		

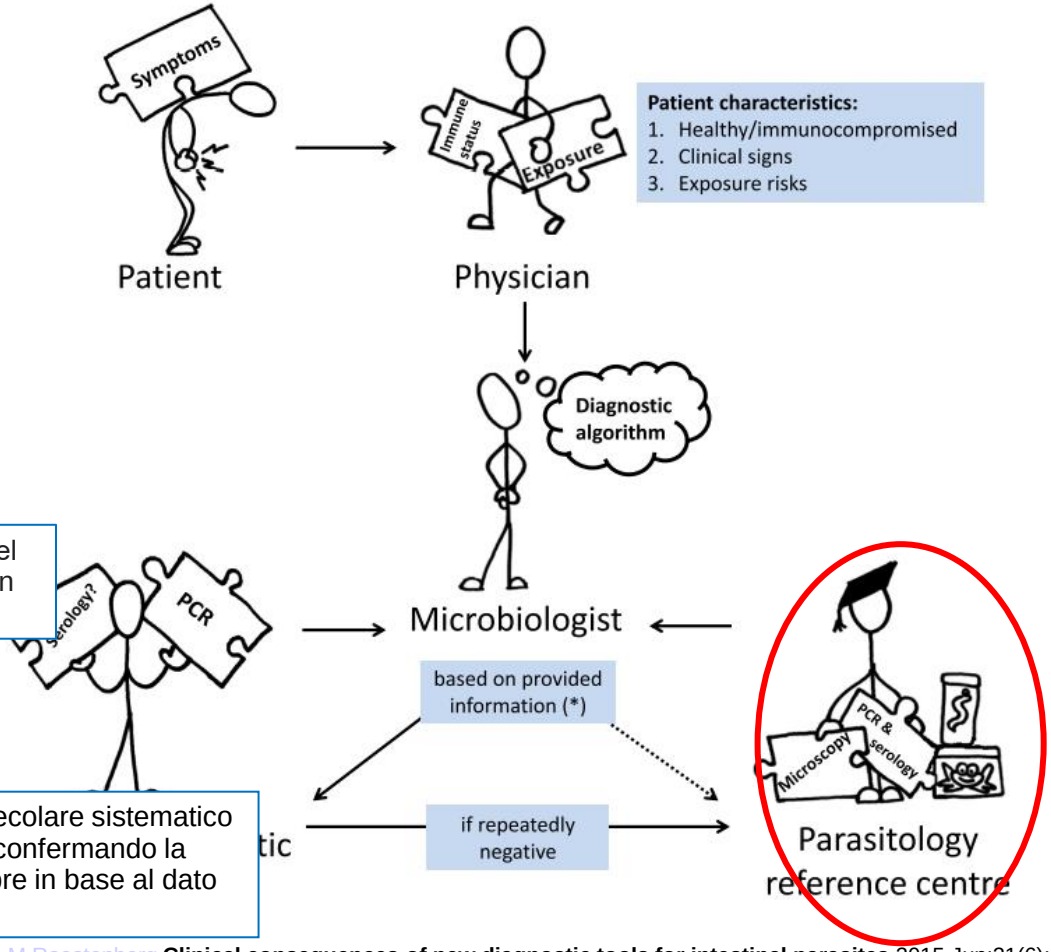
NELLA DIAGNOSTICA PARASSITOLOGICA DI ROUTINE?

Test più appropriati sulla base di segni, sintomi clinici e grado di esposizione del paziente.
La scheda anamnestica è ESSENZIALE.

Per l'interpretazione dei risultati è necessario un costante scambio di informazioni tra clinico e parassitologo, per determinare la rilevanza clinica del risultato.

E' fondamentale una valutazione attenta, clinica e tecnica del risultato: leggere i cicli di amplificazione, correlare il dato con l'anamnesi e l'epidemiologia del paziente.

Un possibile algoritmo potrebbe prevedere lo screening molecolare sistematico per i classici Protozoi ed Elminti più frequenti in *routine,* confermando la positività o la negatività con le metodiche tradizionali, sempre in base al dato clinico ed epidemiologico



L van Lieshout, M Roestenberg **Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites** 2015 Jun;21(6):520-8

Cosa portare a casa

- La PCR multiplex offre importanti vantaggi sia in termini di sensibilità e specificità, di risparmio economico e di tempo favorendo un *turn-around time* rapido, grazie alla possibilità della tipizzazione molecolare con un tempo di risposta ottimizzato quando la PCR è accoppiata all'estrazione automatizzata del DNA.
- RT-PCR rileva basso numero di copie di DNA, indipendentemente dallo stadio del parassita
- Nei casi di poliparassitismo RT-PCR è in grado di rilevare coinfezioni che altrimenti potrebbero essere ignorate
- Il molecolare evidenzia solo alcuni parassiti, gli altri sono lasciati alla microscopia
- La PCR multiplex fornisce una valida strategia nella diagnostica parassitologica, combinata però con le metodiche tradizionali, in quanto l'esperienza del parassitologo e la conferma microscopica rimangono fondamentali.
- La diffusione delle tecniche bio-molecolari potrebbe causare la perdita dell'esperienza della parassitologia tradizionale costruita dopo anni. Sarà necessario, pertanto, cercare di non perdere le conoscenze acquisite e anzi diffonderle.
- Lo studio conferma la necessità della raccolta multicentrica dei campioni per poter valutare i test in commercio, compito importante per il CoSP dell'AMCLI.

Conclusioni

- 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

Conclusioni 1

- Le tecniche di biologia molecolare applicate alla parassitologia hanno gli stessi problemi di quelle applicate ad altri patogeni:
  - Difficoltà di estrazione con pochi metodi validati
  - Presenza di sostanze inibenti l'amplificazione
  - Interferenze con alterazione delle curve
  - Rischio di false positività
  - Difficoltà interpretazione curve
  - Disponibilità apparecchiature adeguate
  - Personale con esperienza in biologia molecolare
  - Costi??

Costi

O&P tradizionale

3 campioni
3 Filtrazioni e concentrazioni
3 vetrini a fresco
3 vetrini con Dobell
1 GIEMSA
1 Ag Giardia e Cryptosporidium
1 Ag E. histolytica
30 minuti Parassitologo esperto

Rimborso attuale

Parassiti intestinali dopo concentrazioni	Euro 5,8
Dopo Giemsa	Euro 4,05
Antigeni per parassiti	Euro 14,50
Tot	Euro 24,35

PCR DFT

1 campione in due aliquote
1 filtrazione e concentrazione
1 vetrino a fresco
1 vetrino con Dobell
1 PCR Protozoi
1 PCR Elminti

10 minuti Parassitologo esperto

Costi

Dopo concentrazioni	Euro 2/3,0
Dopo Giemsa	Euro 4,05
PCR Protozoi	Euro 6/8,0
PCR Elminti	Euro 6/8,0
Tot	Euro18/24

Coltura per Strongyloides	Euro 11,00
Tot	Euro 30/35

Nomenclatore

Codici «nuovo» Nomenclatore 2017 ci sono

90.83.A ACIDI NUCLEICI DI MICRORGANISMI (BATTERI, VIRUS, MICETI, PROTOZOI) RICERCA IN MATERIALI BIOLOGICI VARI MULTIPLEX. Almeno cinque microrganismi di uno o più gruppi di microganismi. Incluso estrazione, amplificazione, rilevazione. NAS

91.05.A PARASSITI [ELMINTI, PROTOZOI] ACIDI NUCLEICI IN MATERIALI BIOLOGICI NAS RICERCA QUALITATIVA/QUANTITATIVA. Incluso estrazione, amplificazione, rilevazione.

91.05.D PROTOZOI ENTERICI RICERCA ACIDI NUCLEICI MULTIPLEX. Almeno E. histolytica, Cryprtospridium, Giardia. Incluso estrazione, amplificazione, rilevazione.

Ticket Lombardia 36 Euro

Conclusioni 2

Aggiornamento Percorso Diagnostico
per Protozoi e Elminti Intestinali
SOLO
Conoscendo valori e limiti delle RT-PCR

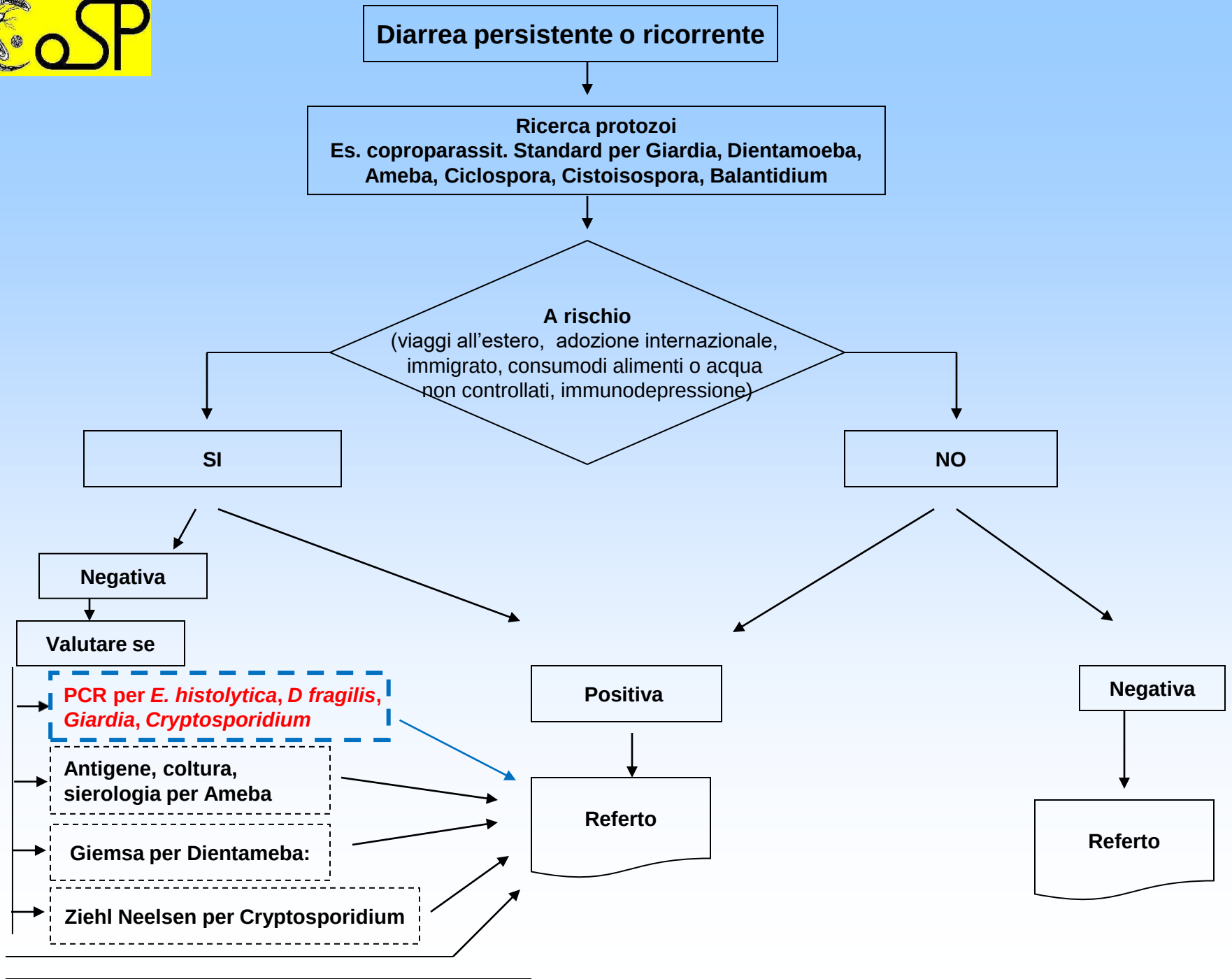

Diarrea persistente o ricorrente
Ricerca protozoi
Es. coproparassit. Standard per Giardia, Dientamoeba, Ameba, Ciclospora, Cistoisospora, Balantidium
A rischio
(viaggi all'estero, adozione internazionale, immigrato, consumodi alimenti o acqua non controllati, immunodepressione)
SI
NO
Negativa
Valutare se
PCR per E. histolytica, D fragilis, Giardia, Cryptosporidium
Antigene, coltura, sierologia per Ameba
Giemsa per Dientameba:
Ziehl Neelsen per Cryptosporidium
Positiva
Referto
Negativa
Referto

Fig. 33. Algoritmo A: tecniche tradizionali

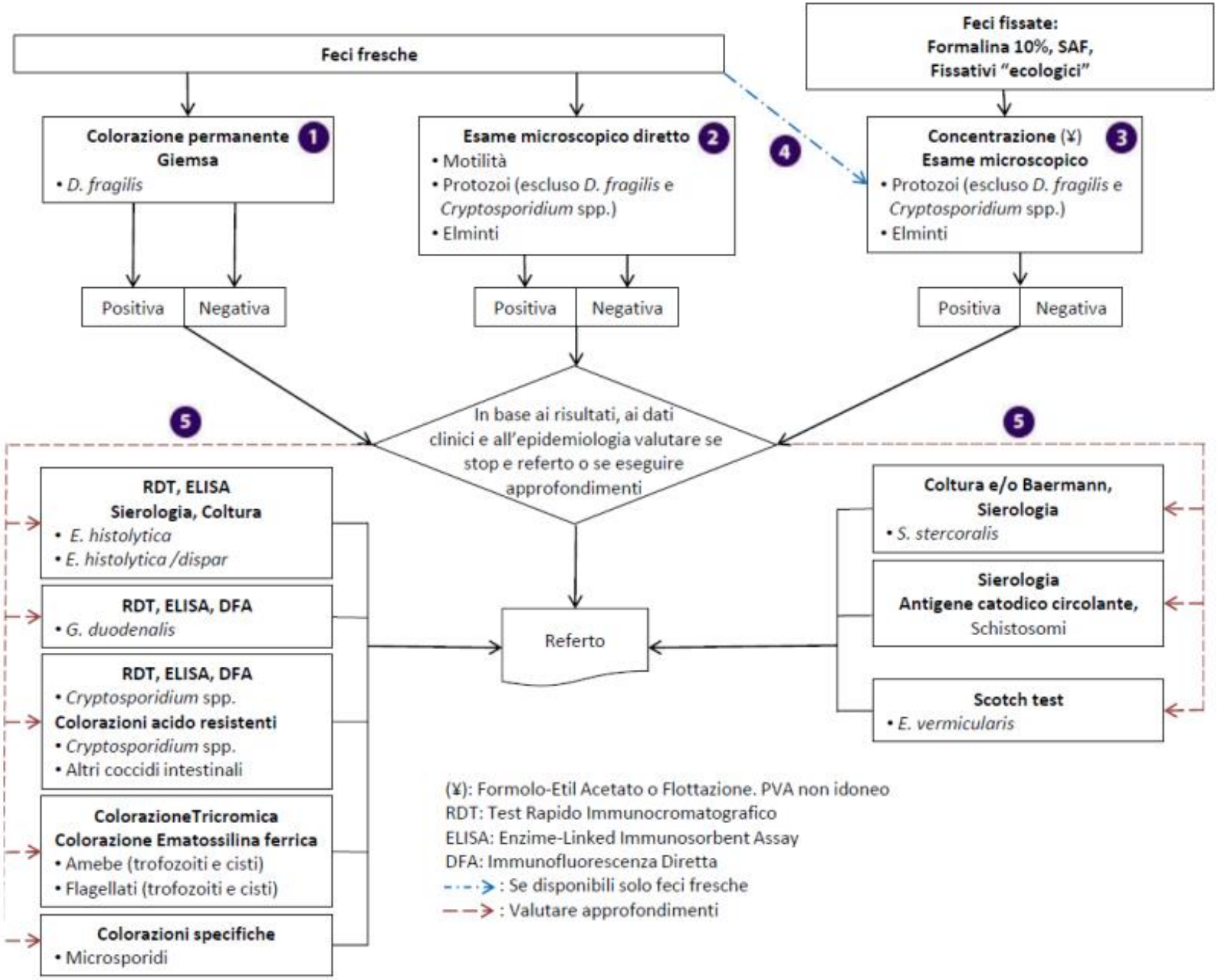
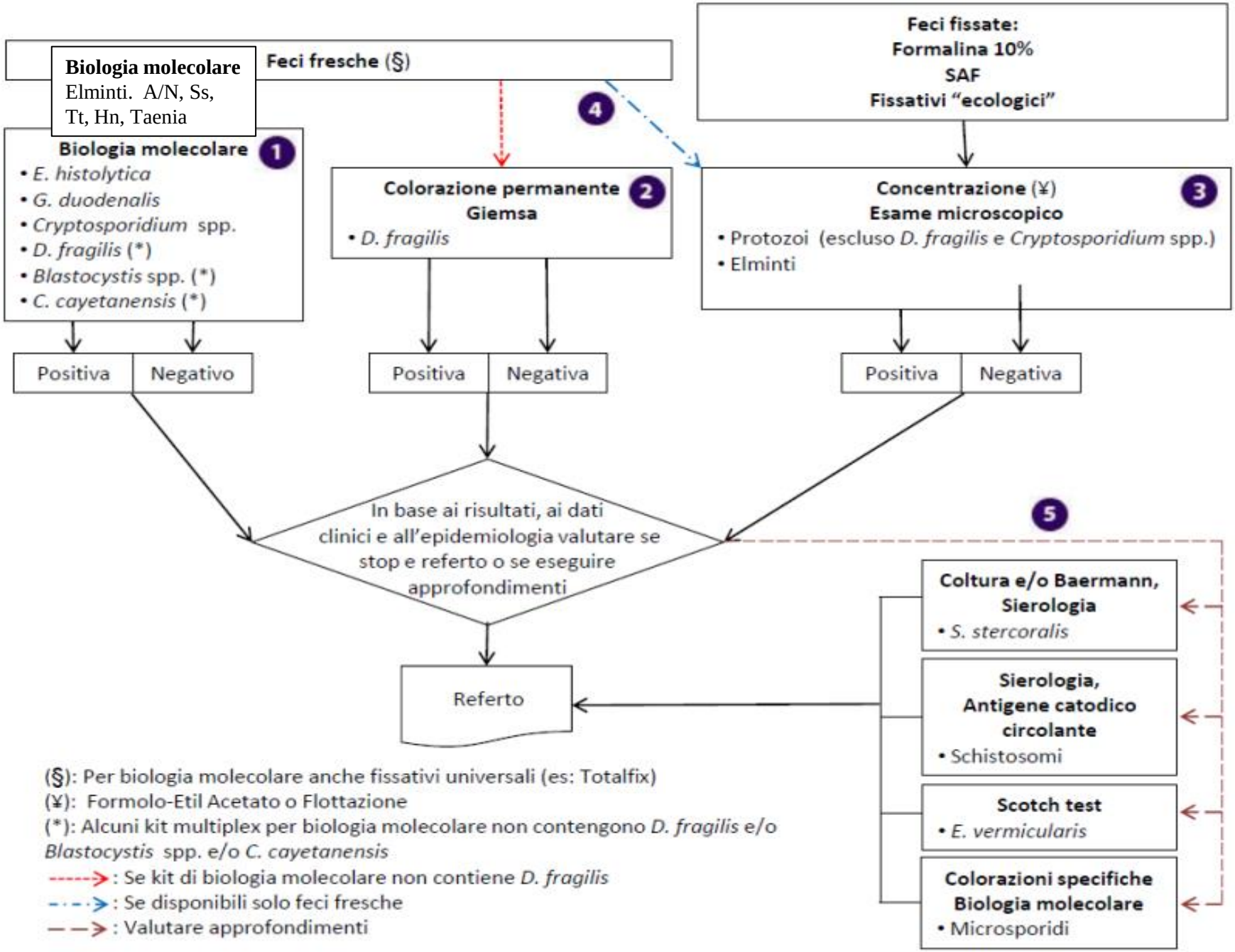


Fig. 34. Algoritmo B: tecniche di biologia molecolare



DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern

DPDx Home
Parasites A-Z Index
Monthly Case Studies
Diagnostic Procedures
Blood Specimens
Stool Specimens
Safety
Specimen Collection
Specimen Processing
Shipment
Staining
Microscopic examination
Detection of parasite antigens
Molecular diagnosis
Extraction of Parasite DNA from Fecal Specimens
Morphologic comparison of intestinal parasites
Serum/Plasma Specimens
Other Specimens
Diagnostic Assistance
Training
Contact Us

DPDx

Stool Specimens - Molecular Diagnosis

Microscopic examination is still considered the "gold standard" for the diagnosis of parasitic diseases. If an unequivocal identification of the parasite can not be made, the stool specimen can be analyzed using molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR). PCR amplified fragments can be analyzed by using restriction fragment length polymorphisms (RFLP) or DNA sequencing if further characterization is needed.

Specimen Collection

If PCR is being requested on a stool specimen, the specimen must be collected in a preservative that is compatible with molecular detection. Fixatives/preservatives with acceptable performance for PCR include TotalFix, Unifix, modified PVA (Zn- or Cu-based), and Ecofix. Stool specimens in these preservatives can be stored and shipped at room temperature. Alternatively, stool specimens can be collected in a clean vial and kept unpreserved; however, these specimens must be stored cold or frozen and shipped either refrigerated (4°C) or frozen (shipped with dry ice). Trichrome stained smears (for *E. histolytica*/*E. dispar*) or acid-fast smears (for *C. parvum* or *C. cayetanensis*) should accompany the stool specimen when requesting PCR for any of these protozoa. All stained smears will be read first and if an identification of the parasite can be made, PCR will not be performed. Click here for more information about shipping stool specimens to CDC.

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

For specific applications or when commercial fixatives are not an option, the stool can be mixed in potassium dichromate 2.5% (1:1 dilution) or in absolute ethanol (1:1 dilution) and shipped refrigerated.

DNA Extraction

It is necessary to extract DNA from the stool specimens for PCR detection. Click to view the DNA extraction protocols recommended for molecular diagnosis of intestinal parasites.

PCR Analysis

Molecular detection of *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, and *E. dispar* is performed at CDC by both conventional PCR and real-time PCR. Conventional PCR is available for microsporidia. Click on the links above to learn more about the specific tests and to view analysis of PCR results for the respective parasites listed.

Microscopic examination is still considered the "gold standard" for the diagnosis of parasitic diseases. If an unequivocal identification of the parasite can not be made, the stool specimen can be analyzed using molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR). PCR amplified fragments can be analyzed by using restriction fragment length polymorphisms (RFLP) or DNA sequencing if further characterization is needed.

Specimen Collection

If PCR is being requested on a stool specimen, the specimen must be collected in a preservative that is compatible with molecular detection. Fixatives/preservatives with acceptable performance for PCR include TotalFix, Unifix, modified PVA (Zn- or Cu-based), and Ecofix. Stool specimens in these preservatives can be stored and shipped at room temperature. Alternatively, stool specimens can be collected in a clean vial and kept unpreserved; however, these specimens must be stored cold or frozen and shipped either refrigerated (4°C) or frozen (shipped with dry ice). Trichrome stained smears (for E. histolytica/E. dispar) or acid-fast smears (for C. parvum or C. cayetanensis) should accompany the stool specimen when requesting PCR for any of these protozoa. All stained smears will be read first and if an identification of the parasite can be made, PCR will not be performed. Click here for more information about shipping stool specimens to CDC.

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

For specific applications or when commercial fixatives are not an option, the stool can be mixed in potassium dichromate 2.5% (1:1 dilution) or in absolute ethanol (1:1 dilution) and shipped refrigerated.

Stool Specimens - Extraction of Parasite DNA from Fecal Specimens Using FastDNA® Kit

Note 1: Divide fecal specimens into multiple aliquots and store at -80°C without preservatives. Optionally, samples can be preserved in potassium dichromate (1:1 dilution with 5% w/v) or in absolute ethanol (1:1 dilution) and stored at 4°C.

Note 2: This protocol is a summary of the procedure included in the FastDNA® kit manual provided by the manufacturer. Please refer to the manual for detailed product information and protocols.

Special equipment needed:
FastPrep FP120 Disrupter (available from Q-Biogene, Carlsbad, Calif.) or similar product.

https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/moleculardx.html

Aggiornato al marzo 2024

antigen-based EIA used at CDC has a sensitivity of 96% and a specificity of 98%. The commercial EIA kits that are currently available have comparable specificity but slightly lower sensitivity.

Immunocompromised persons with disseminated strongyloidiasis usually have detectable IgG antibodies despite their immunosuppression, though false negative results can occur. Cross-reactions in patients with filariasis, schistosomiasis, and ascariasis may also occur, depending on the antigen used. Cross-reactivity to sera from *S. fuelleborni*-infected patients probably occurs, but performance has not been evaluated.

A positive serologic test result warrants continuing efforts to establish a parasitological diagnosis followed by anthelminthic treatment, as positive serology does not differentiate between past and current infection. Serological reversion to antibody negative status is unusual in most strongyloidiasis patients, although antibody levels decrease markedly within 6 months after successful chemotherapy. Thus, serologic monitoring may be useful in the follow-up of treated patients.

Molecular Detection

PCR and LAMP methods may be used to detect strongyloidiasis in fresh, frozen, or non-formalin fixed stool specimens. Sensitivity and specificity vary depending on the reference test used to calculate such characteristics; false negatives and false positives do occur.

Laboratory Safety

Standard precautions for the processing of stool specimens apply. Unfixed stools and/or larval coprocultures should be handled with caution to avoid percutaneous exposure to filariform larvae. Agar plate cultures should be sealed with parafilm or masking tape prior to incubation. Because filariform larvae often migrate to condensation droplets on the lids of agar plate cultures care should be taken when reading cultures or opening culture plates. PPE including gloves, gowns, and eyewear should always be worn when working with samples potentially containing live larvae. Lugol's iodine (1% povidine iodine; 10,000 ppm) or 70-100% ethanol may be used to kill *S. stercoralis* infective larvae on exposed skin and 70% ethanol may be used to disinfect contaminated surfaces.

For Lab Use Only

Patient Full Name (first and last): **PHN #, RHRN #, or unique identifier #:** **Ordering Physician:**	**Please note:** Stool from patients who have used antacids, non-absorbable antidiarrheals, barium, bismuth, mineral oil enemas in the preceding 2 weeks are not suitable for ova & parasite examination, as these may cause a significant drop in yield. Certain antibiotics (e.g. tetracyclines) can also decrease yield of ova & parasite examination.

Ordering Physician must complete History Sections below.

CLINICAL HISTORY			TRAVEL HISTORY	
Onset of Symptoms / / YYYY MMM DD			**Travel to, or residence in endemic area.** ☐ **Yes** **If yes; MUST COMPLETE BELOW** ☐ **No**	
Symptoms and Signs: (check all that apply)			**Countries visited:** ↓	**Dates:** ↓
bloody stool	☐	**M OP F:**		
eosinophilia	☐	**M OP F:**		
Immunocompromised Specify:_____	☐	**M OP F:**		
EXPOSURE HISTORY			**Antimicrobials:** ☐ **Yes (list below)** ☐ **No**	
Exposure to: (check all that apply)			_____	
Raw/undercooked meat: Specify:	☐	**M OP F:**	**Other Clinical Information:**	
Raw/undercooked fish: Specify:	☐	**M OP F:**		
Previous confirmed parasitic infection: Specify: _____	☐	**M OP F:**		

FIG 1 Example of a case history form that can be used to guide clinician ordering for stool ova and parasite testing.

Modulo raccolta dati clinico-anamnestici: esempio

MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA - OSPEDALI RIUNITI - BERGAMO

Direttore: dott. Antonio Goglio - Tel. 035.269012, Fax. 035.266666, e mail: microbiologia@ospedaliriuniti.bergamo.it

Reparto _____ Centro di costo _____

Scrivere in stampatello

Data di invio [ ][ ][ ] giorno mese anno

Data di prelievo: [ ][ ][ ] giorno mese anno

Alle ore: [ ][ ]

N. accettazione R.I.
applicare qui l'etichetta autoadesiva

Ricerca di **Parassiti nelle feci**

Sig. _____ M F

Ricoverato il: [ ][ ][ ] giorno mese anno

Nato il: [ ][ ][ ] giorno mese anno

Medico richiedente _____
Firma leggibile o timbro

MATERIALE:

- ❑ Feci in formalina
- ❑ Scotch test

Riservato al Laboratorio

1. PAESE DI NASCITA

_____

❑ Italia ❑ Europa o Nord America ❑ Africa
❑ Asia ❑ America latina ❑ Australia

2. ABITUDINI

HA CONTATTI CON ANIMALI?
❑ no ❑ sì _____

ABITA IN AMBIENTE RURALE?
❑ no ❑ sì _____

SVOLGE LAVORO AGRICOLO?
❑ no ❑ sì _____

3. VIAGGI ALL'ESTERO

SOGGIORNO IN PAESI EXTRACOMUNITARI ❑ no ❑ sì

ULTIMI SOGGIORNI ALL'ESTERO

Paese _____
dal _____ al _____

Paese _____
dal _____ al _____

4. MOTIVO DELL'ESAME

❑ Controllo dopo soggiorno in Paese tropicale
❑ Controllo dopo trattamento di un parassita (specificare)
_____
❑ Un familiare/convivente è affetto da (specificare)
_____
❑ Eosinofilia
❑ Altro (specificare) _____

5. SINTOMATOLOGIA

Iniziata il _____

❑ FEBBRE
❑ DIARREA ACQUOSA ❑ DOLORI ADDOMINALI
❑ DIARREA CON SANGUE ❑ VOMITO
❑ PRURITO CUTANEO ❑ PRURITO ANALE
❑ TOSSE
❑ NAUSEA/INAPPETENZA
❑ RUSH / ESANTEMA
❑ _____

6. DATI DI LABORATORIO
(riportare se disponibili)

EOSINOFILIA (%) _____

COPROCOLTURA (ES. COLTURALE DELLE FECI)
❑ negativa ❑ Salmonella
❑ Shigella ❑ Campylobacter
❑ _____

7. TERAPIE IN CORSO

Terapia con cortisone ❑ no ❑ sì

Altro _____-_____

8. PRECEDENTI PARASSITOSI

HA CONTRATTO PARASSITOSI IN PASSATO ?
❑ no ❑ sì _____