associazione microbiologi clinici italiani

Ente del Terzo Settore

CATANZARO - 12 APRILE 2024

GASTROENTERITI INFETTIVE:
NUOVI PERCORSI DIAGNOSTICI

Hotel Marechiaro
Viale Stazione ss 18
88040 Gizzeria Lido /Lamezia Terme (CZ)

www.amcli.it

ASUGI Azienda Sanitaria Universitaria Giuliano Isontina

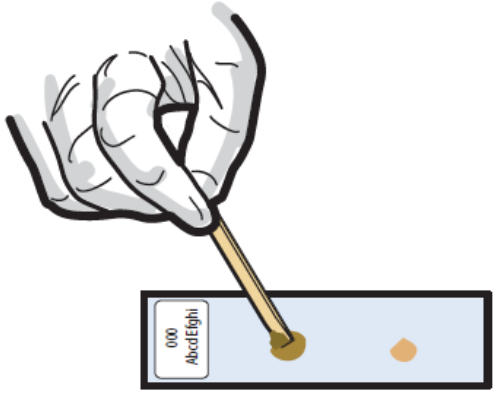
REGIONE AUTONOMA FRIULI VENEZIA GIULIA

L'approccio molecolare nella parassitosi intestinale: la nostra esperienza

Libera Clemente
SSD Laboratorio Spoke Area Isontina, Monfalcone (GO)
Azienda Sanitaria Universitaria Giuliano Isontina

Conflitto di interessi

Dichiaro di non avere alcun conflitto di interesse riguardo all’argomento trattato.



AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Clinical Microbiology Reviews®

PRACTICAL GUIDANCE FOR CLINICAL MICROBIOLOGY

Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract

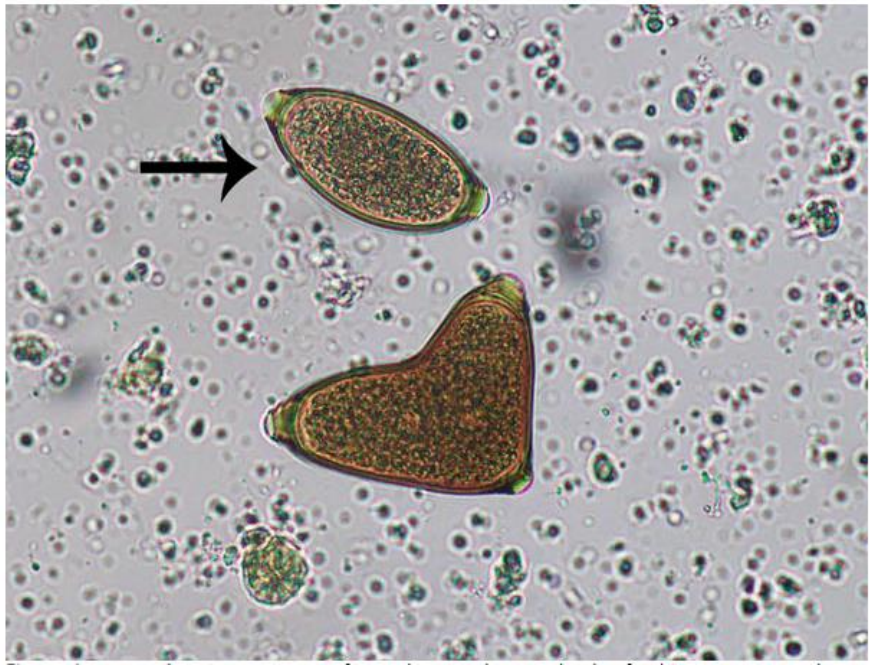
Lynne S. Garcia,[a] Michael Arrowood,[b] Evelyne Kokoskin,[c,d] Graeme P. Paltridge,[e] Dylan R. Pillai,[f] Gary W. Procop,[g,h] Norbert Ryan,[i] Robyn Y. Shimizu,[j] Govinda Visvesvara[b]

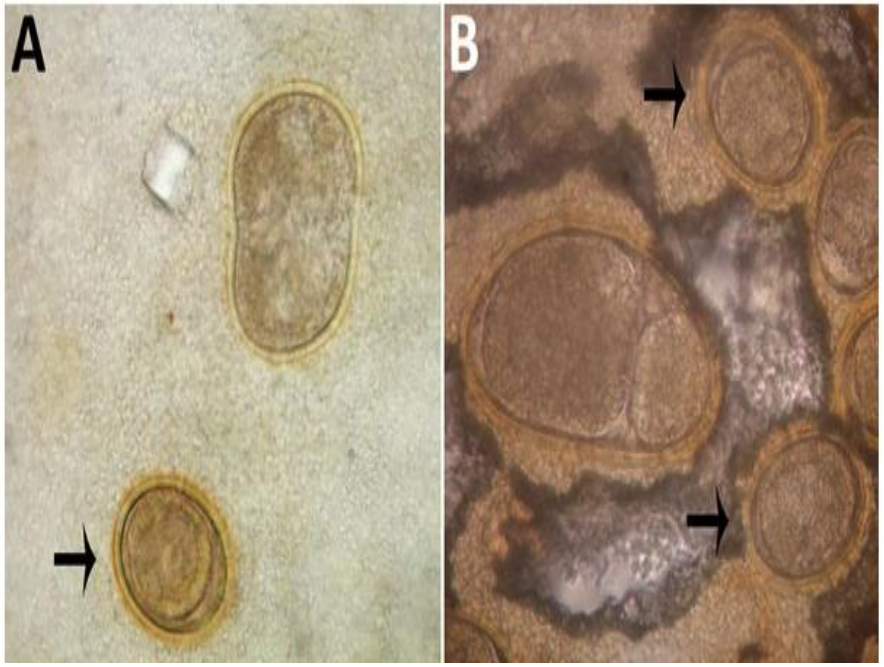
The O&P exam (which involves direct wet mount, concentration, and permanent staining of the smear) could be considered a routine test method for the detection of a number of different intestinal protozoa and helminth infections; this procedure is moderately sensitive but relatively nonspecific.

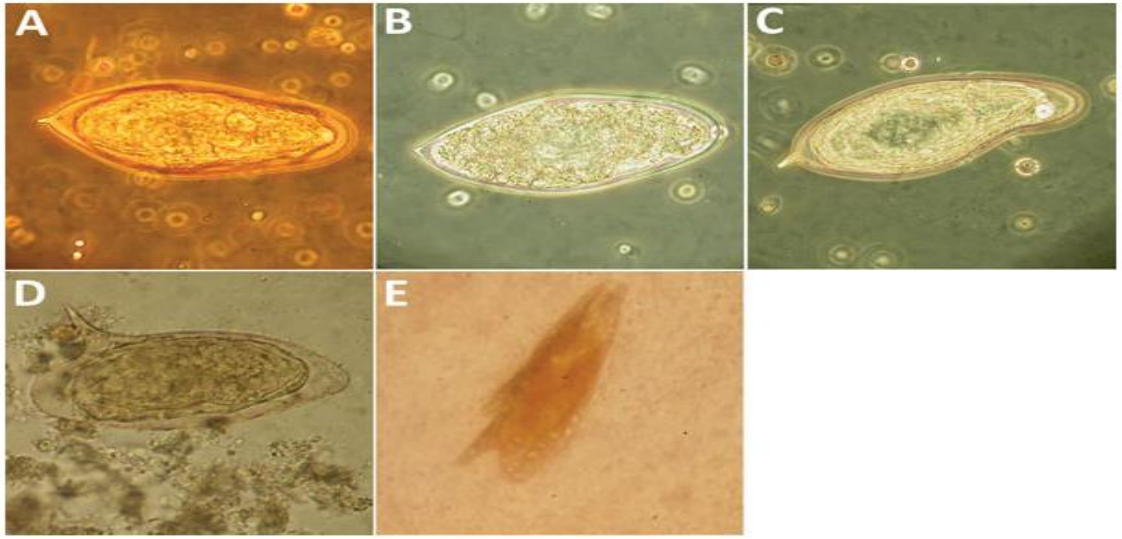
La microscopia è il *gold standard* nella diagnostica parassitologica.

La diagnostica microscopica è particolarmente complicata:

- solo operatori con esperienza sono in grado di produrre una diagnosi corretta
- la morfologia dei parassiti può essere alterata da una cattiva conservazione del campione
- la carica parassitaria di alcuni campioni può essere così bassa da rendere difficile l'identificazione dei rari parassiti presenti nel campione
- l'escrezione può essere intermittente (es. *G. intestinalis*)
- la morfologia da sola non permette di distinguere tra parassiti molto simili ma con diversa patogenicità (es. *E. histolytica* da *E. dispar*)
- scarsa specificità







Ascaride?

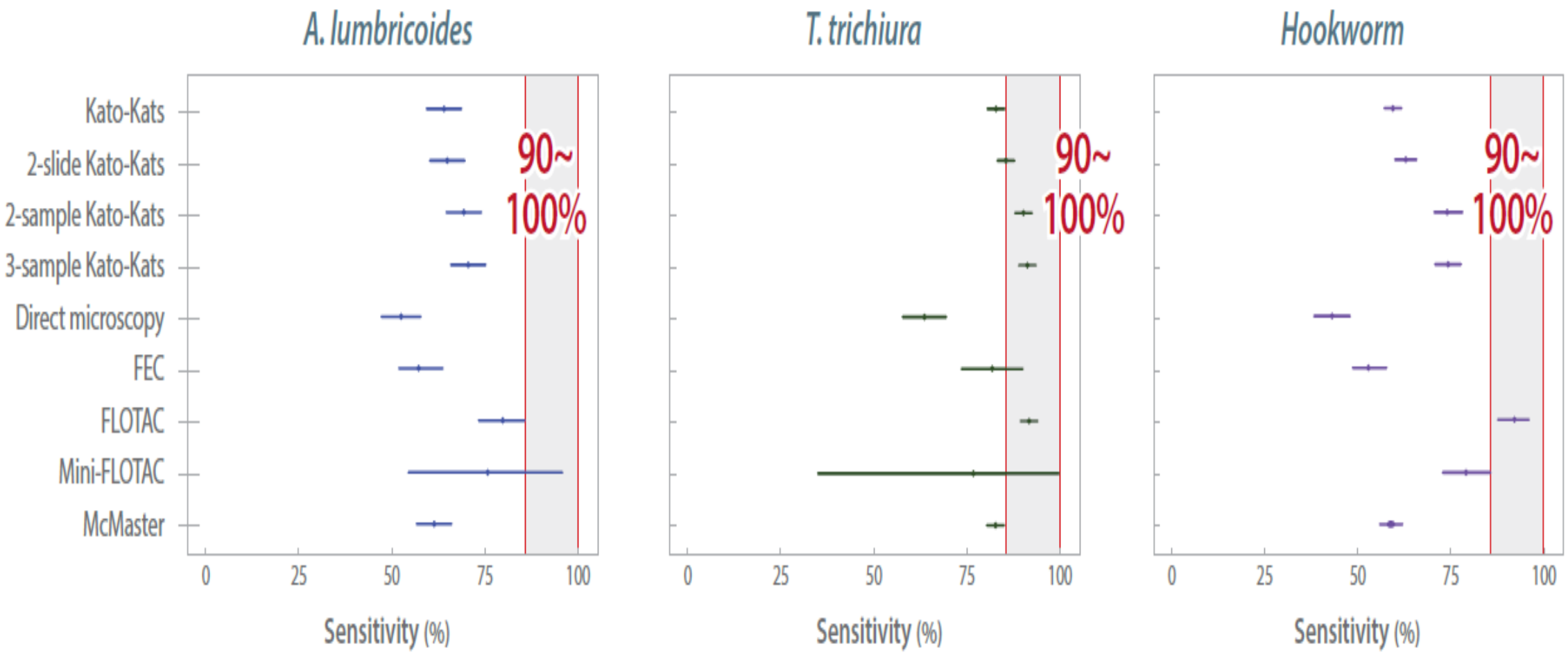
↓

<u>Albendazolo</u>

Hymenolepis diminuta?

↓

<u>Praziquantel</u>



Depending on the sampling method and species, the sensitivity varies widely4).

4) B. Nikolay et al. International Journal for Parasitology (2014)

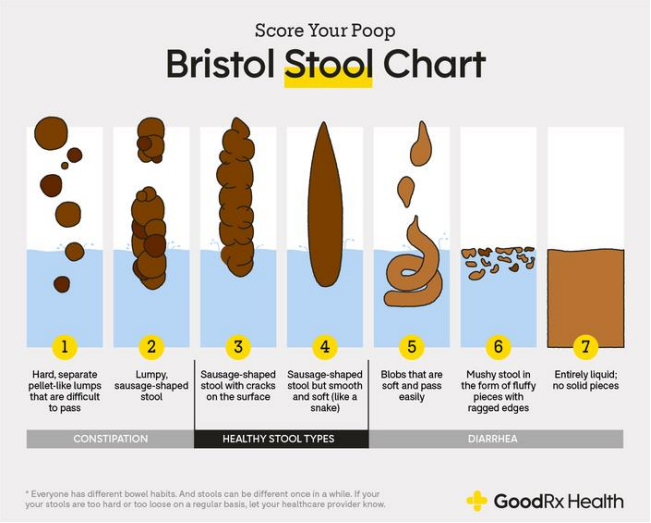
Viaggi

Dimagrimento

Eosinofilia

Astenia

Diarrea



Stato immunitario

Dati clinici

+

Dati epidemiologici

=

Sospetto diagnostico/

test microbiologici

Meteorismo

Disturbi intestinali

Prurito anale

Centers for Disease Control and Prevention
CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People™

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Clinical Microbiology Reviews®

PRACTICAL GUIDANCE FOR CLINICAL MICROBIOLOGY

Check for updates

Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract

Lynne S. Garcia,[a] Michael Arrowood,[b] Evelyne Kokoskin,[c,d] Graeme P. Paltridge,[e] Dylan R. Pillai,[f] Gary W. Procop,[g,h] Norbert Ryan,[i] Robyn Y. Shimizu,[j] Govinda Visvesvara[b]

Microscopic examination is still considered the “gold standard” for the diagnosis of parasitic diseases.

REVIEW

Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites

L. van Lieshout[1] and M. Roestenberg[1,2]
1) *Department of Parasitology and* 2) *Department of Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands*

Article | Published: 08 May 2003

Triple Faeces Test: An Effective Tool for Detection of Intestinal Parasites in Routine Clinical Practice

T. van Gool, R. Weijts, E. Lommerse & T. G. Mank

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).

ORIGINAL ARTICLE 10.1111/j.1469-0691.2009.02894.x

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*

In conclusion, implementation of paraPCR for the diagnosis of parasitic gastrointestinal infections yields the benefits of:

- **less hands-on time**
- **higher sensitivity**
- **direct differentiation of *E. histolytica* from other *Entamoeba***
- **a shorter turnaround time**
- **only one unpreserved stool sample**

TABLE 2. Results of microscopy of complete Triple Faeces Test sets and paraPCR for individual unpreserved stool samples (n = 397)

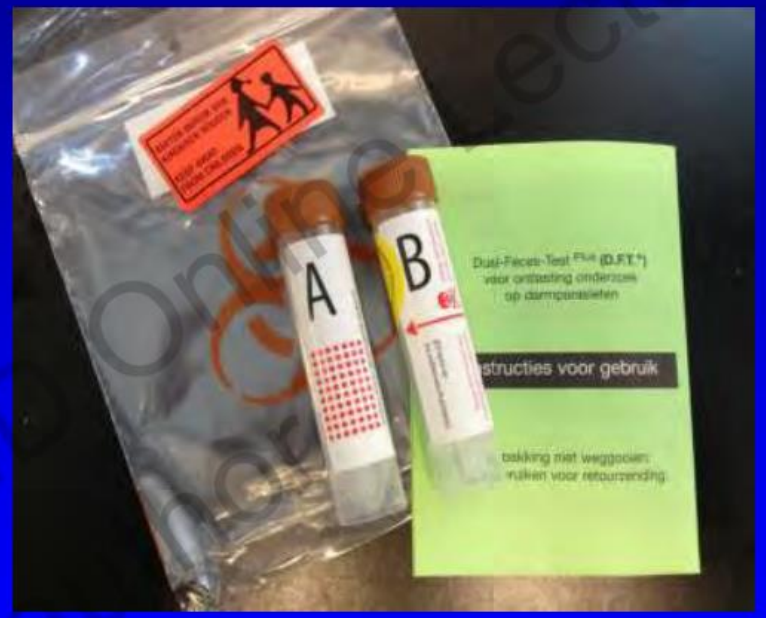
Target	Microscopy$^+$/ PCR$^+$	Microscopy$^+$/ PCR$^-$	Microscopy$^-$/ PCR$^+$	Microscopy$^-$/ PCR$^-$
Entamoeba histolytica	1	–	–	396
Giardia lamblia	28	1[a]	16	352
Cryptosporidium parvum/hominis	2	–	1	394
Dientamoeba fragilis	64	5	58	270

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*.

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

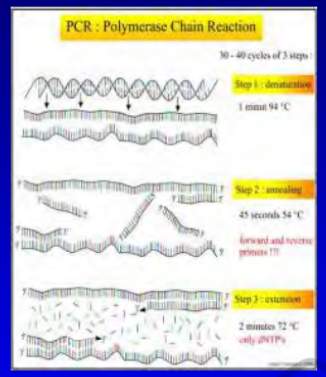
© by ESCMID Online Lecture Library

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%

PCR- diagnosis for intestinal parasites: nowadays commonly used in many laboratories!



Often diagnosis of 4 (5) infections:

Entamoeba histolytica
Giardia lamblia
Cryptosporidium
Dientamoeba fragilis

Blastocystis species

1 day stool Sampling possible !

Advantages: - very high sensitivity
- one day sampling
- easy to combine with PCR's of virol. and bacteriology.....

Disadvantages: - limited no. of targets in routine
- relative costly, expensive apparatus needed

ESCMID Online Lecture Library © by author

Parasitol Res. 2013 Feb;112(2):595-601. doi: 10.1007/s00436-012-3171-8. Epub 2012 Nov 1.

Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt

John T Nazeer [1], Khalifa El Sayed Khalifa, Heidrun von Thien, Mahmoud Mohamed El-Sibaei, Magda Youssef Abdel-Hamid, Ranya Ayman Samir Tawfik, Egbert Tannich

Table 2 Results of microscopy and multiplex real-time PCR for the detection of enteric protozoa among 396 patients with diarrhea and 202 control subjects

Organism	Microscopy[a]				Multiplex real-time PCR			
	Diarrheal cases		Control		Diarrheal cases		Control	
	No	%	No	%	No	%	No	%
E. histolytica/dispar	32	8.0	0	0	5[b]	1.3	1[c]	0.5
G. intestinalis	110	27.8	1	0.25	141	35.6	4	2.0
Cryptosporidium spp.	4	1.0	0	0	8	2.0	3	1.5
Combined *Giardia* and *E. histolytica/dispar*	11	2.8	0	0	2[b]	0.5	0	0
Combined *Giardia* and *Cryptosporidium* spp.	0	0	0	0	3	0.75	0	0
Combined *E. hist/dispar Giardia/Cryptosporidium*	0	0	0	0	1[b]	0.25	0	0
Negative for the three parasites	239	60.4	201	99.75	236	59.6	194	96.0

[a] After formol ethyl-acetate concentration

[b] All the eight real-time positive-*Entamoeba* cases among the group of diarrheal patients were of the nonpathogenic *E. dispar*

[c] This is the only case found positive for *E. histolytica* by multiplex real-time PCR

for simultaneous detection of E. histolytica, G. intestinalis, and Cryptosporidium spp. The results indicate that among diarrheal patients in Egypt G. intestinalis is the most common protozoan parasite, with prevalence rates of 30.5 and 37.1 %, depending on the method used (microscopy vs. multiplex real-time PCR). Cryptosporidium spp. was detected in 1 % of the diarrheal patients by microscopy and in 3 % by real-time PCR. While E. histolytica/dispar was detected in 10.8 % by microscopy, less than one fifth of them (2 %) were found true positive for Entamoeba dispar by real-time PCR. E. histolytica DNA was not detected in any of the diarrheal patients. In comparison with multiplex real-time PCR, microscopy exhibited many false positive and negative cases with the three parasites giving sensitivities and specificities of 100 and 91 % for E. histolytica/dispar, 57.8 and 85.5 % for G. intestinalis, and 33.3 and 100 % for Cryptosporidium spp.

Multiplex real-time PCR not only simplifies the detection of several enteric pathogens, but also reduces the cost of unnecessary treatment following misdiagnosis.

Tecniche molecolari, contro:

- Difficoltà di estrazione con pochi metodi validati
- Mancanza di un *gold standard*
- Presenza di sostanze inibenti l'amplificazione
- Interferenze con alterazione delle curve
- Difficoltà di interpretazione curve
- Disponibilità apparecchiature adeguate
- Personale con esperienza in biologia molecolare
- Costi
- Il molecolare evidenzia solo alcuni parassiti

Metodo tradizionale vs RT-PCR

	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 %	100 %	99,4 %	99,7 %
Entamoeba histolytica	87 %	100 %	94%	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.

Per gentile concessione della dott.ssa Ester Oliva, AMCLI-CoSP

Am. J. Trop. Med. Hyg., 95(3), 2016, pp. 508–513
doi:10.4269/ajtmh.16-0266
Copyright © 2016 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Review Article

Molecular Diagnostics for Soil-Transmitted Helminths

Elise M. O'Connell[1]* and Thomas B. Nutman[1]

[1]*Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

TABLE 2

Reported sensitivities of qPCR for diagnosing STH compared with reported stool microscopy sensitivities*

Organism	Sensitivities reported by qPCR	Sensitivities by microscopy
Ascaris lumbricoides	85.7%,†[20] 98%,**[21] 100%[52]	71.4%,†[20] 70,** [21] 88%[52]
Hookworms	96.9%,†[20] 78.9%,[61] 75.7–83.3%,¶‖[23] 98%,[21] 100%[36]	31.3%,†[20] 79.2–88.8%,‖[23] 32%**[21]
Strongyloides stercoralis	76%,¶[62] 83.3%,†[20] 83.3–88.9%,§[61] 11.6%,¶‖[23] 93.8%,‡‡[51] 86.4%,§‖[26] 84.7%††[27]	16.7%,†[20] 50%,‡[62] 28.3%‖[23]
Trichuris trichiura	100%[52]	88%[52]

qPCR = quantitative polymerase chain reaction; STH = soil-transmitted helminth.

*Unless otherwise stated, gold standard in determining true positives was the sum of positives by qPCR and microscopy method used. Study specific microscopy methods (if described) are listed below.

†Single stool sample prepared with a combination of Kato-Katz, wet preparation, and formol-ether concentration methods.

‡Single stool sample subjected to Baermann funnel concentration and Koga agar plate culture.

§Sensitivity excludes those positive by Koga agar and negative by Baermann funnel. See text for details.

¶No internal controls used to rule out PCR inhibition in this study.

‖Mathematical modeling to determine gold standard taking into account results of single stool subjected to FLOTAC, Kato-Katz, Baermann, and qPCR.

**Single stool sample prepared by Kato-Katz, with duplicate slides assessed by two technicians.

††Gold standard a combination of nested PCR, Koga agar plate culture, and formalin ether concentration.

‡‡Single stool sample subjected to formalin-ethyl acetate concentration, agar plate culture, and Harada Mori technique.

VALUTAZIONE DI UN PANNELLO MULTIPLEX REAL-TIME PCR PER LA DIAGNOSI DI ELMINTI INTESTINALI

N.F.J. Schillaci[1], M. Cuntrò[1], E. Oliva[2], L. Clemente[3], S. Varani[4], N. Menegotto[5], V. Besutti [6], A. Bruno[7], L. Petrullo[8], C. Farina[1], A. Raglio[1,9],Gdl CoSP-AMCLI[9]

1 ASST-Papa Giovanni XXIII, Bergamo; 2 AUSL -IRCCS Santa Maria Nuova, Reggio Emilia; 3 ASUGI, Monfalcone; 4 Policlinico Sant'Orsola - Malpighi, Bologna; 5 ULSS 2 MarcaTrevigiana, Treviso; 6 Azienda Ospedaliera Universitaria, Padova; 7 IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; 8 AORN Ospedale dei Colli, Napoli; 9 Gdl CoSP-AMCLI.

- 181 campioni da 15 ospedali italiani
- Estrazione meccanica con biglie magnetiche
- Kit multiplex in biologia molecolare

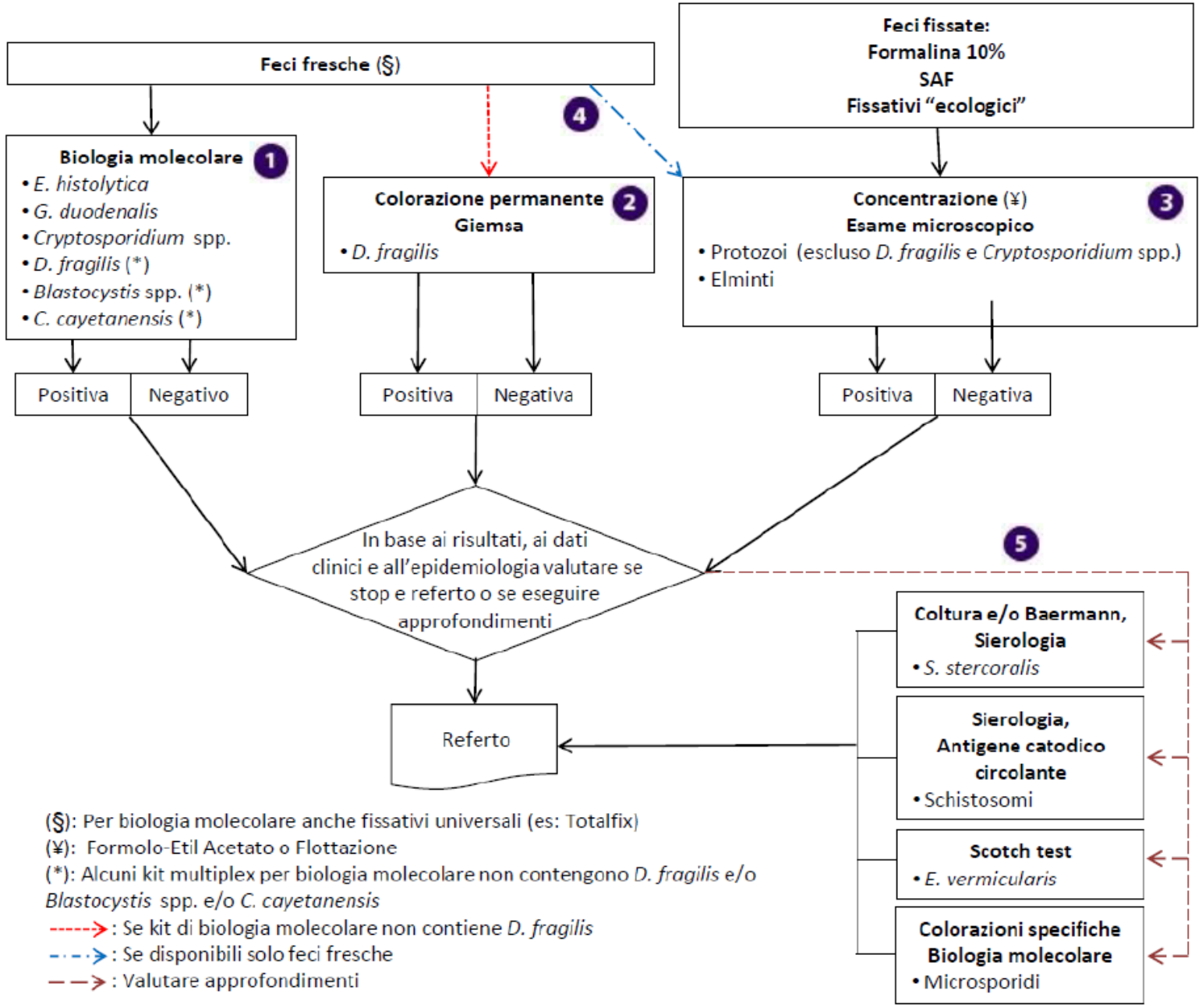
Conclusioni:

- Bassa sensibilità per *A. lumbricoides, E. vermicularis* e *S. stercoralis*
- Alta sensibilità per Ancilostomidi, *Taenia* spp e *Hymenolepis spp.*

Specie	VP	FP	FN	% specificità	% sensibilità
Taenia spp	24	1	0	99%	100%
A. lumbricoides	5	0	9	100%	36%
Hookworm	10	0	1	100%	91%
E. vermicularis	25	0	33	100%	43%
S. stercoralis	23	0	26	100%	59%
Hymenolepis spp	4	O	1	100%	80%
T. trichiura	1	0	0	NV	NV

Tab.2 Suddivisione dei risultati in base alla concordanza tra esame standard e PCR.

Fig. 34. Algoritmo B: tecniche di biologia molecolare

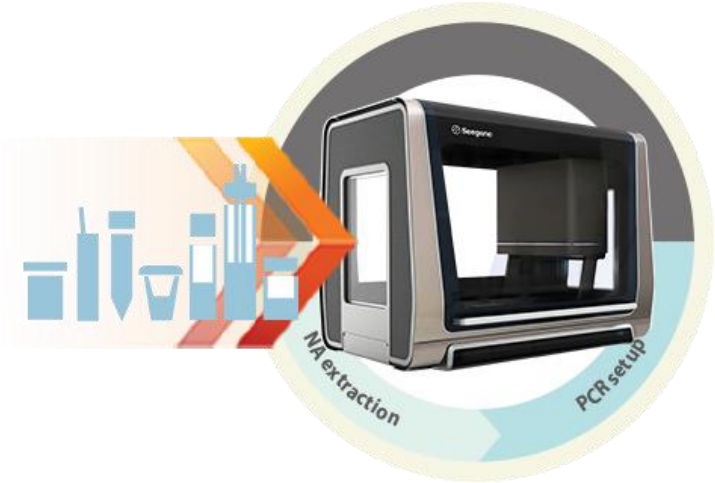


La nostra esperienza

Feci fresche

Concentrazione → Microscopia

Faecal swab → Real Time PCR



L'estrazione degli acidi nucleici dal materiale fecale è un punto critico. Le feci contengono numerose sostanze interferenti o inibitorie la reazione di amplificazione del DNA. È necessario utilizzare sistemi di estrazione validati.

Campione di feci fresche

Biologia molecolare protozoi ed elminti

Esame microscopico dopo concentrazione

In base ai risultati, ai dati clinici e all'epidemiologia valutiamo se stop e referto o eseguire approfondimenti

Referto

Coltura e/o Baermann per *S. stercoralis*

Scotch test per *E. vermicularis*

Biologia molecolare per batteri e virus

1°

- *Blastocystis hominis* (BH)
- *Cryptosporidium* spp. (CR)
- *Cyclospora cayetanensis* (CC)
- *Dientamoeba fragilis* (DF)
- *Entamoeba histolytica* (EH)
- *Giardia lamblia* (GL)
- *Ancylostoma* spp.[1] (AN)
- *Ascaris* spp.[2] (AS)
- *Enterobius vermicularis* (EV)
- *Enterocytozoon* spp. / *Encephalitozoon* spp[3] (EN)
- *Hymenolepis* spp.[4] (HY)
- *Necator americanus* (NA)
- *Strongyloides* spp.[5] (ST)
- *Taenia* spp.[6] (TA)
- *Trichuris trichiura* (TT)

2°

- *Aeromonas* spp. (Aer)
- *Campylobacter* spp. (Cam)
- *Clostridium difficile* toxin B (CdB)
- *Salmonella* spp. (Sal)
- *Shigella* spp./EIEC[5] (Sh/EI)
- *Vibrio* spp. (Vib)
- *Yersinia enterocolitica* (Yer)
- EAEC[1] (*aggR*)
- EPEC[2] (*eaeA*)
- *Escherichia coli* O157 (*E. coli* O157)
- ETEC[3] (*lt/st*)
- Hypervirulent *Clostridium difficile* (CD hyper)
- STEC[4] (*stx1/2*)
- Adenovirus (AdV)
- Astrovirus (AstV)
- Norovirus GI (NoV-GI)
- Norovirus GII (NoV-GII)
- Rotavirus (RotV)
- Sapovirus (SV)

I nostri dati:

Periodo: da dicembre 2023 a marzo 2024

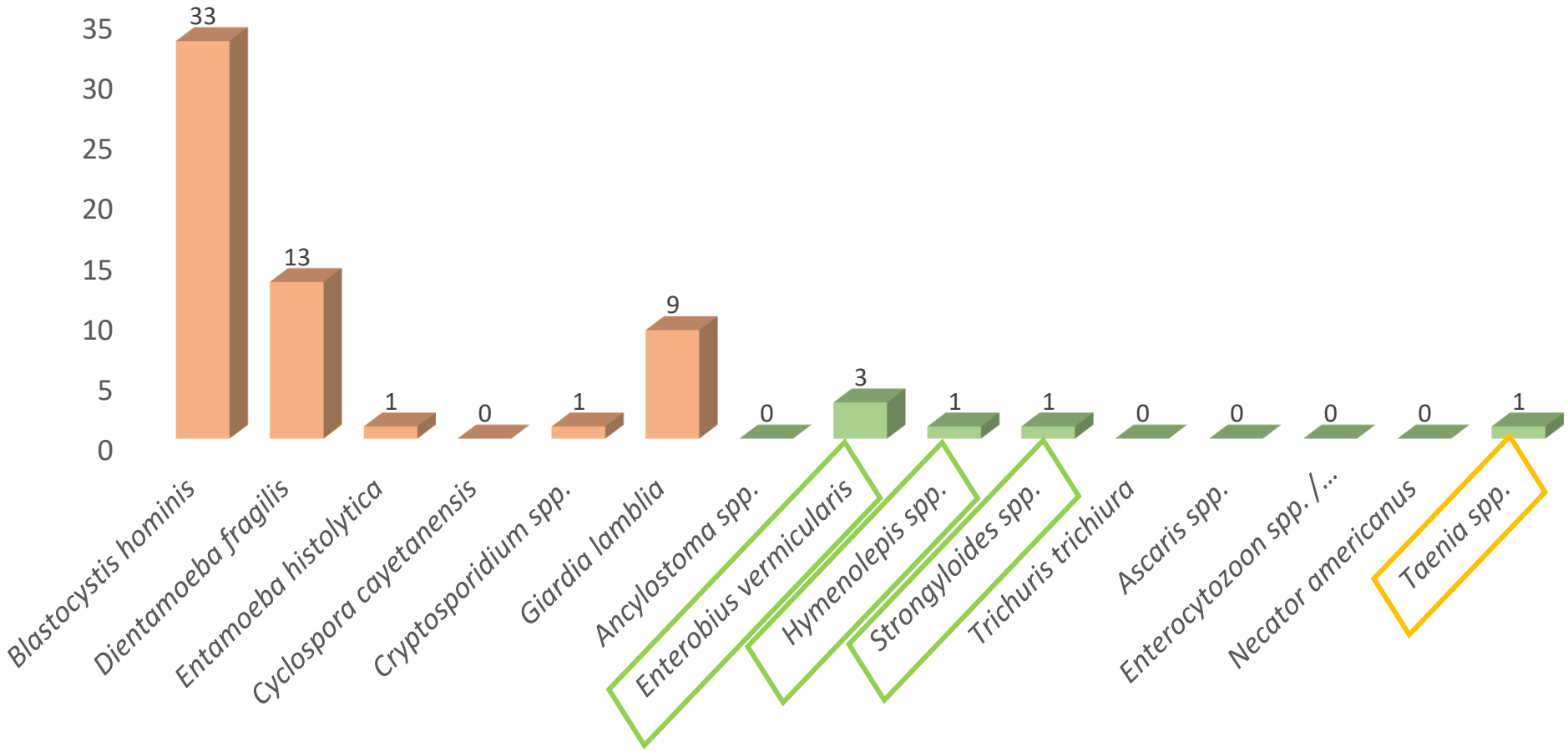
N° pazienti: 582

Range età: 0-100

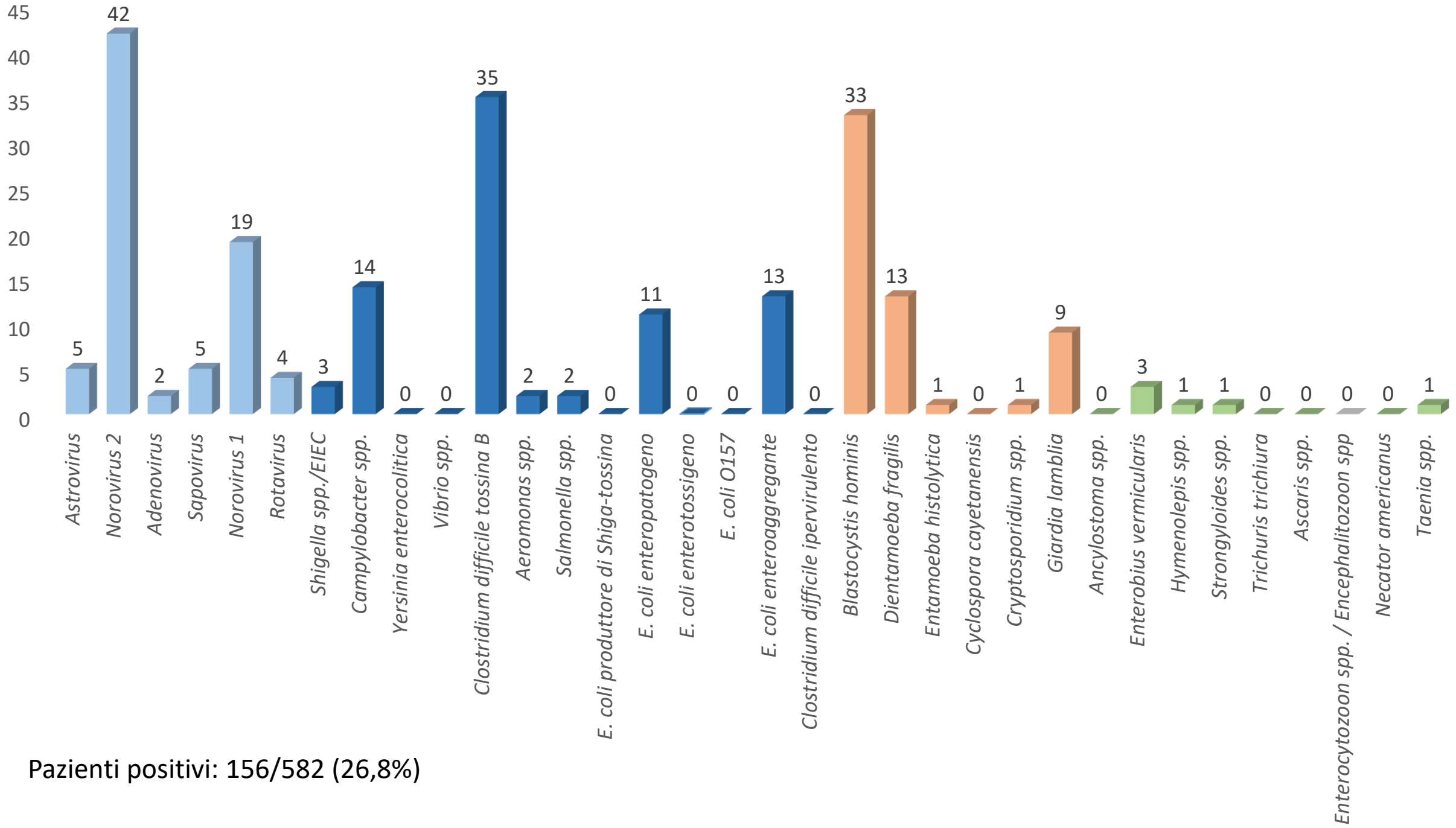
Età media: 62 anni

Maschi: 259

Femmine: 323



Pazienti positivi solo per parassiti: 41/582 (7,0%)



Pazienti positivi: 156/582 (26,8%)

Trends in Parasitology

CellPress REVIEWS

Opinion

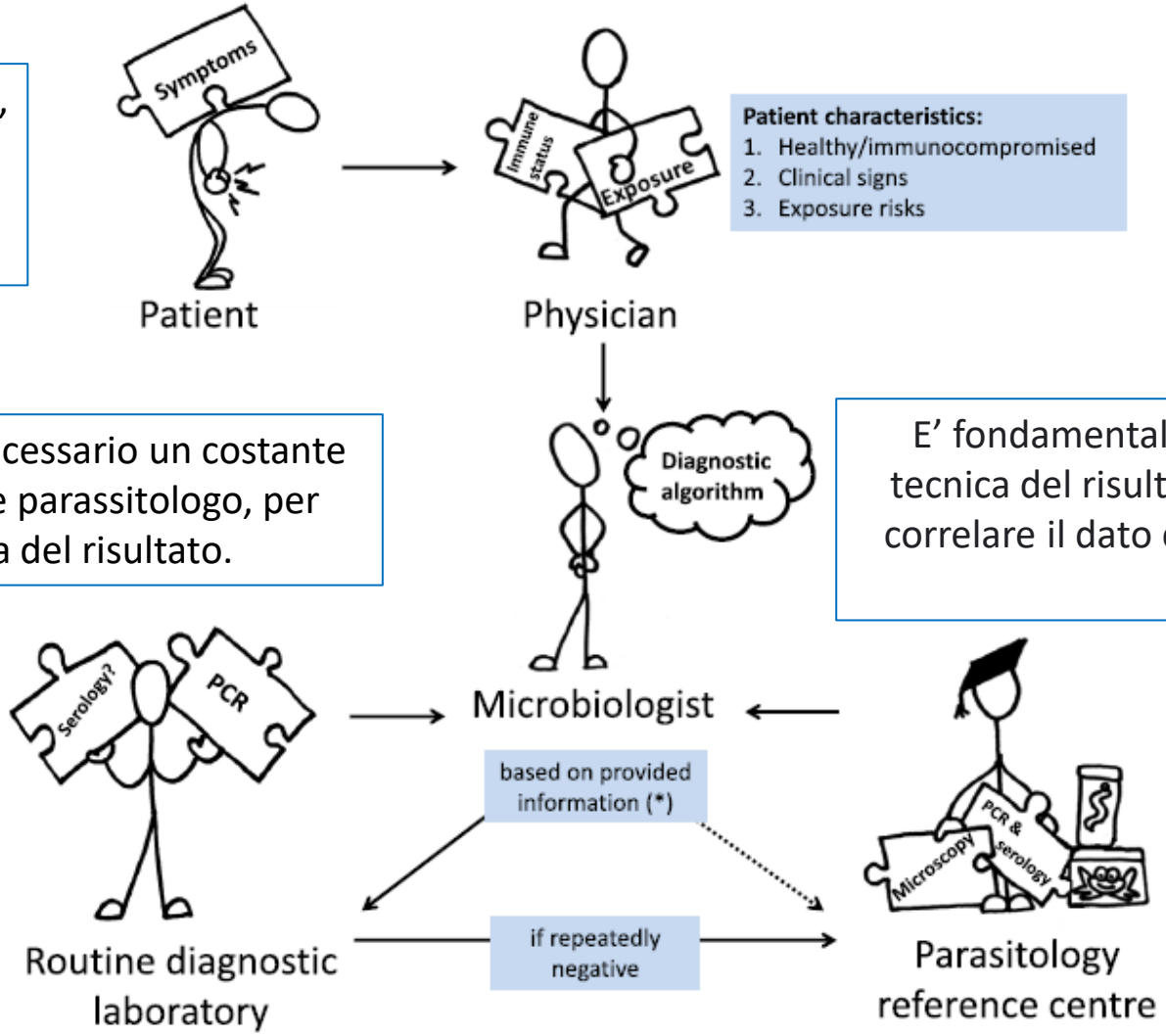
Quantitative PCR-Based Diagnosis of Soil-Transmitted Helminth Infections: Faecal or Fickle?

Marina Papaiakovou,[1,*] Robin B. Gasser,[2] and D. Tim J. Littlewood[1]

SFIDE AFFRONTATE E DA AFFRONTARE

1. conservazione del campione
2. rottura delle uova e delle larve per il rilascio del DNA
3. adeguato recupero del DNA dal campione
4. aumentare la specificità
5. aumentare la sensibilità per le infezioni a bassa carica
6. garantire la riproducibilità dei risultati anche tra laboratori
7. capacità di distinguere tra infezione in atto e infezione pregressa
8. ruolo del DNA libero nelle feci e collegamento tra i limiti di rilevamento e l'entità biologica (ad es. uova, carico di vermi)
9. stabilire quando i bio-marcatori non sono più rilevabili dopo terapia

Test più appropriati sulla base di segni, sintomi clinici e grado di esposizione del paziente.
La scheda anamestica 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 il cicli di amplificazione, correlare il dato con l'anamnesi e l'epidemiologia del paziente.

Un possibile algoritmo potrebbe prevedere lo screening molecolare sistematico dei protozoi in *routine.*

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

Conclusioni:

- Consiglio AMCLI-CoSP un unico campione di feci, poi aliquotato.
- È necessaria l'esperienza sia nella parassitologia tradizionale sia nell'interpretazione dei test di amplificazione, con conoscenza dei dati epidemiologici, biologici, clinici e diagnostici.
- La diffusione delle tecniche bio-molecolari potrebbe causare la perdita dell'esperienza della parassitologia tradizionale.
- 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 ma rileva solo i geni per i quali è stata disegnata.
- Le ditte dovrebbero concordare i pannelli dei test molecolari multiplex con le associazioni scientifiche come AMCLI-CoSP e SoIPa.
- Le metodiche di biologia molecolare non sono indicate per il follow-up dei pazienti infettati.

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.

Grazie per l’attenzione