

# Workshop

## Sorveglianza delle Malattie batteriche invasive

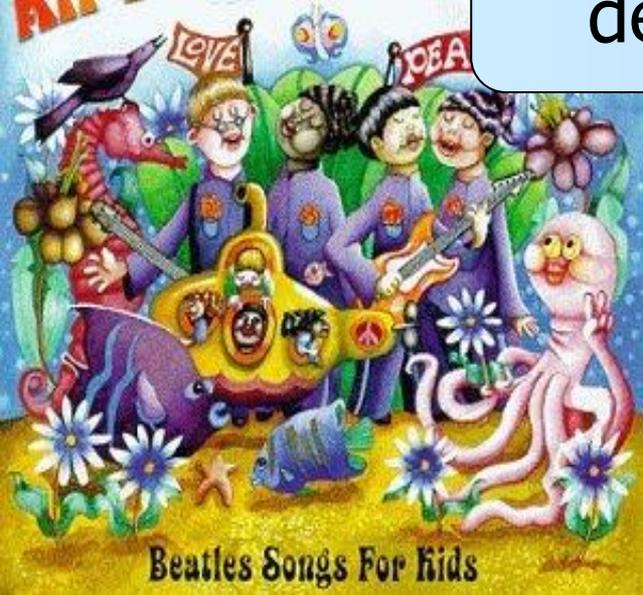
Istituto Superiore di Sanità – Roma 28-29/02/2012



### L'importanza della diagnosi molecolare

**Chiara Azzari**  
**Clinica Pediatrica II**  
**Università di Firenze**

All You Need Is



Di cosa abbiamo bisogno nella diagnosi delle malattie batteriche invasive?

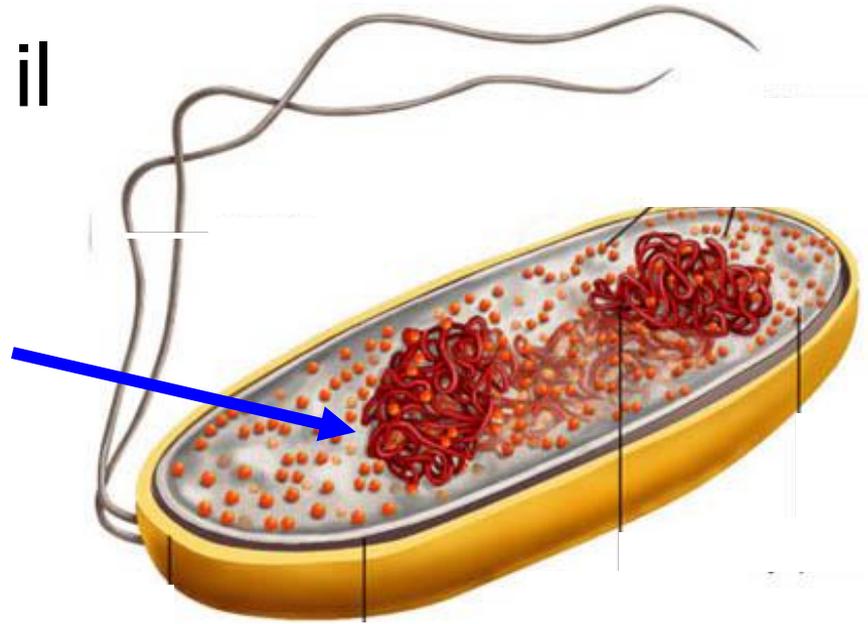
1. Di un metodo che ci dia la diagnosi in poche ore

In modo da fare una terapia adeguata e programmare interventi di profilassi solo quando necessari

2. Di un metodo che ci dia accuratamente il sierotipo, in modo da decidere i programmi di vaccinazione più idonei e monitorarli

Invece di aspettare che il batterio cresca.....

...cerchiamo il suo DNA



Il DNA non si degrada facilmente

● **Ok anche germe non vitale**

● **OK se terapia antibiotica precedente**

● **OK a t°C ambiente anche per giorni**

● **OK anche in fisiologica**

● **OK anche campione "già usato"**

● **tecniche e macchinari semplici**

● **Costo basso**

Acute Bacterial Meningitis Cases Diagnosed by Culture and PCR in a Children's Hospital Throughout a 9-Year Period (2000-2008) in Athens, Greece

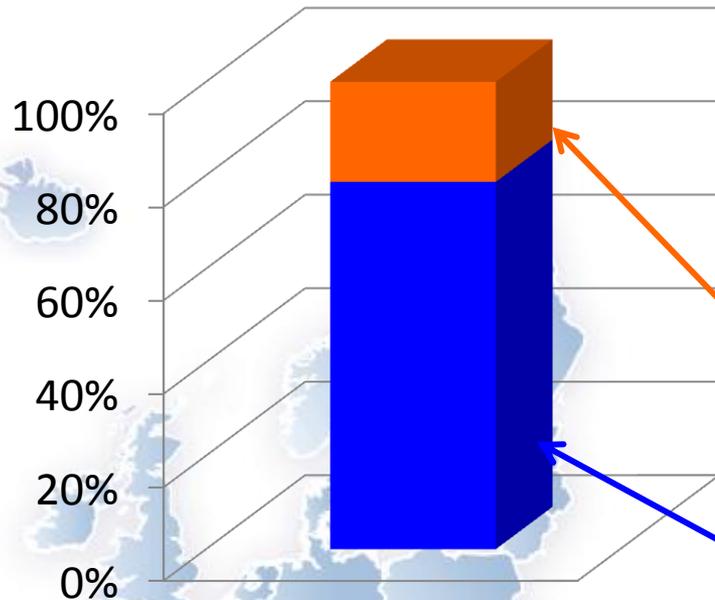
## Quanti casi sono stati diagnosticati con PCR e/o con cultura?

**56 meningiti confermate**

★ **56/56 positive in PCR**

★ **12/56 (21.4%) positive anche in cultura**

★ **44/56 (78.6%) positive soltanto in PCR**



# Etiologies of Bacterial Meningitis in Bangladesh: Results from a Hospital-Based Study

Emily S. Gurley,\* M. Jahangir Hossain, Susan P. Montgomery, Lyle R. Petersen, James J. Sejvar,

*Am. J. Trop. Med. Hyg., 2009; 81: 475-83.*

## Positività di coltura e PCR in ospedali in Bangladesh



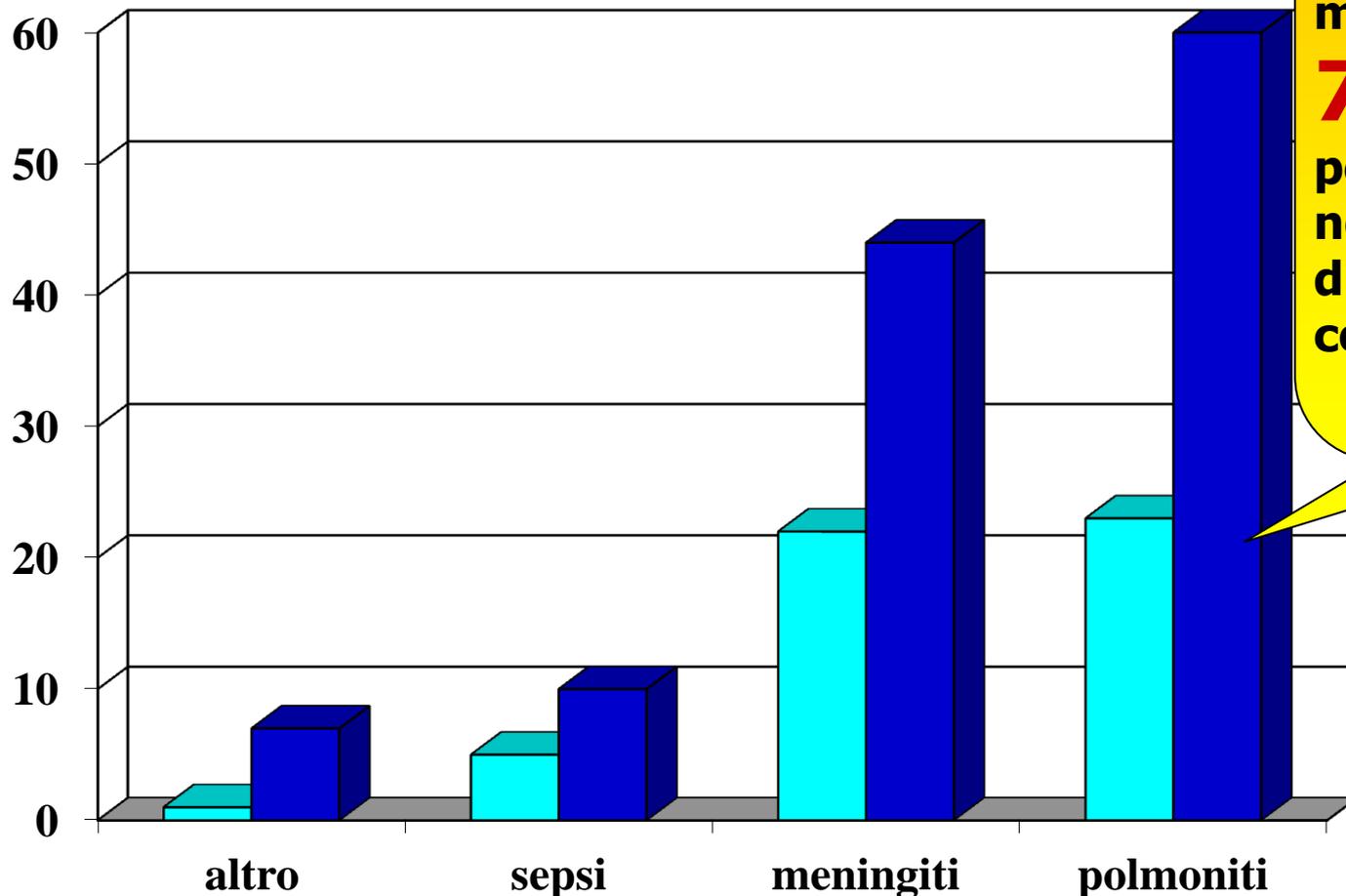
**PCR: 24% meningococco**

**9% pneumococco**

**Coltura: 5%**

*Studi effettuati con la collaborazione del CDC,  
Atlanta, USA*

Casi di IPD (n=163) diagnosticate su **liquidi normalmente sterili** con coltura  o con metodi molecolari 



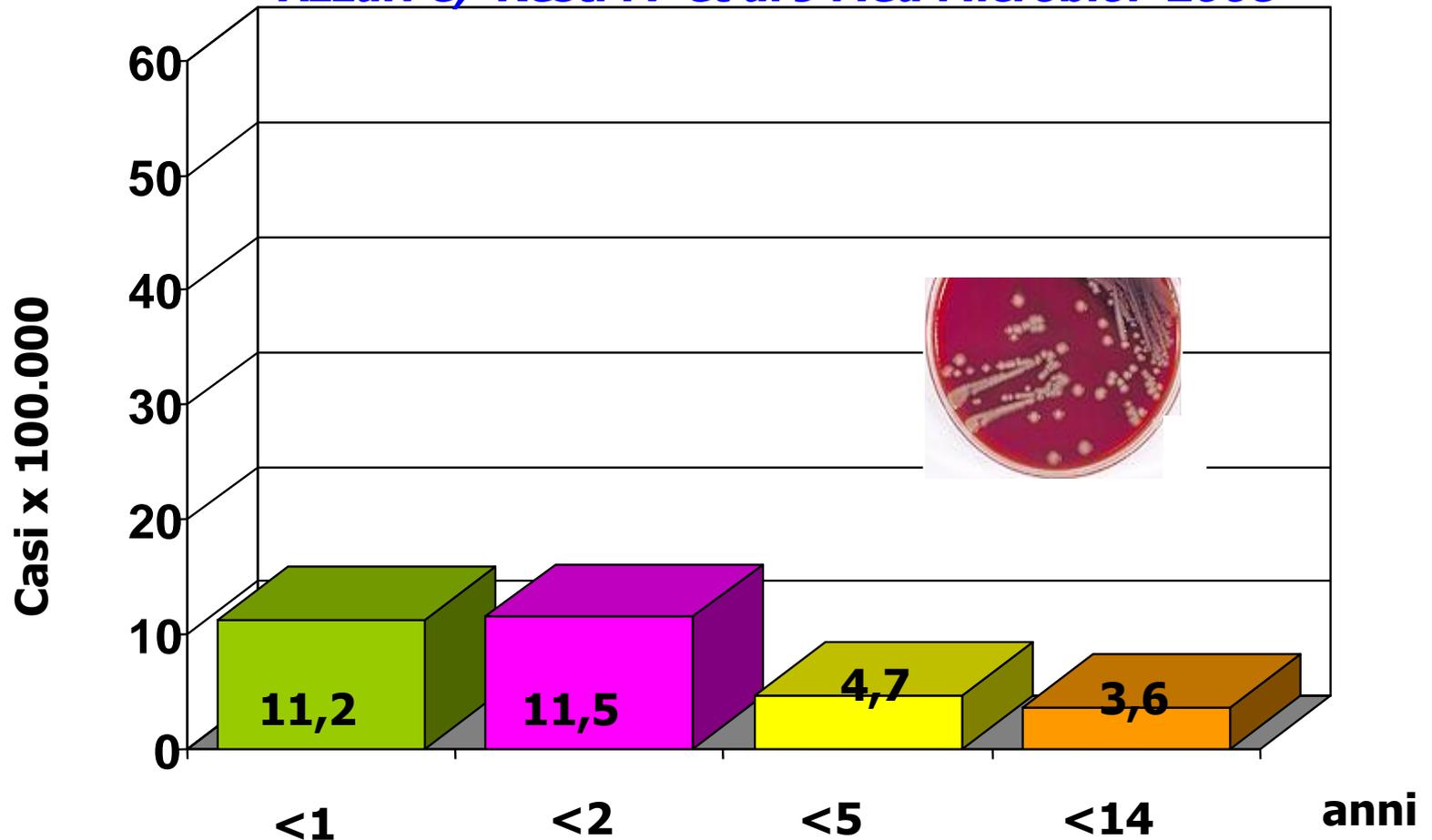
**50.0%** delle meningiti e sepsi e **72.3%** delle polmoniti non sarebbero state diagnosticate con coltura



Azzari, Resti et al., dati **2008**

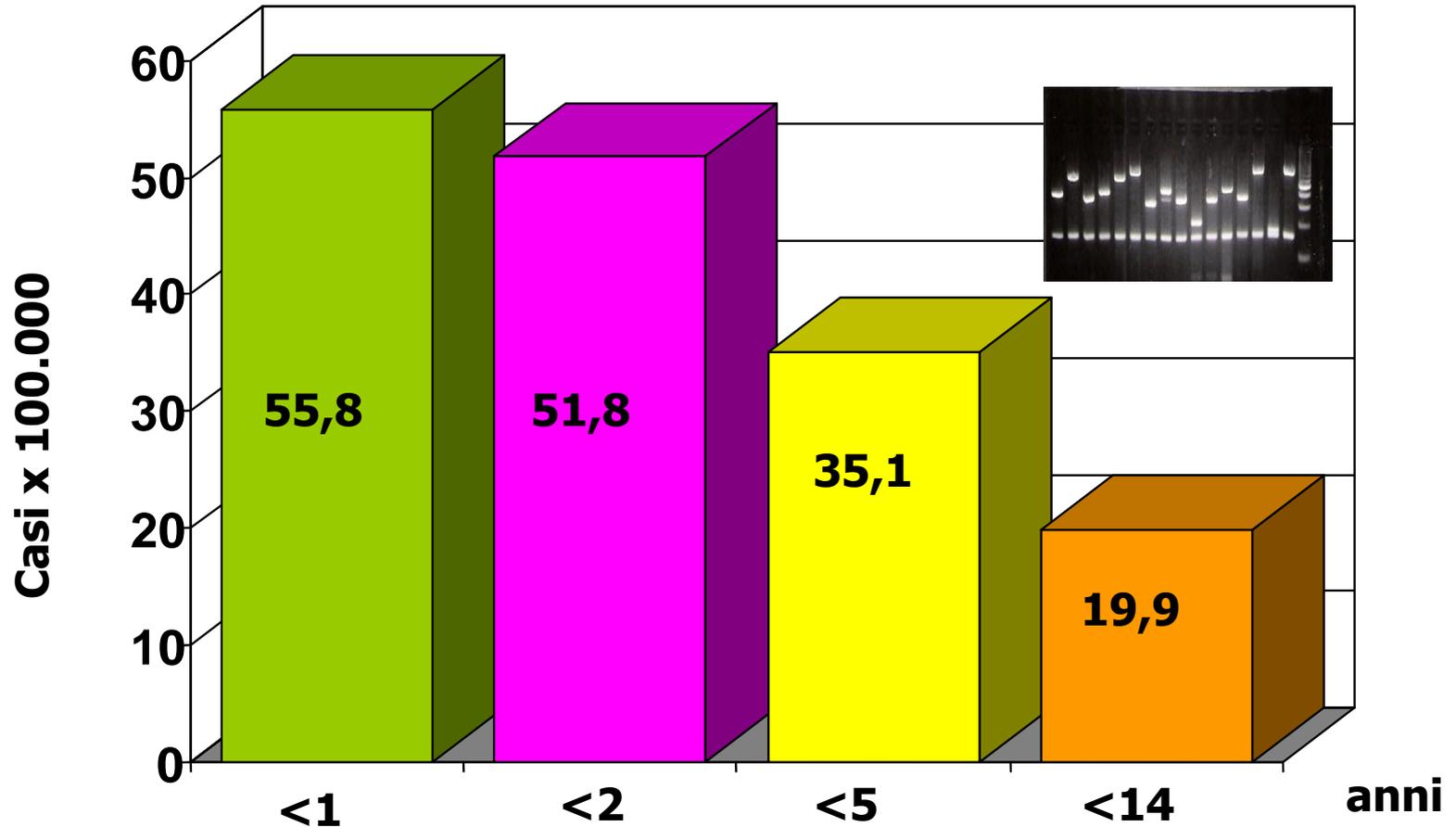
# Incidenza di IPD nella popolazione pediatrica fiorentina valutata mediante coltura

*Azzari C, Resti M et al J Med Microbiol 2008*



# Incidenza di IPD nella popolazione pediatrica fiorentina valutata mediante PCR

*Azzari C, Resti M et al J Med Microbiol 2008*



Siamo certi che trovare il DNA nel sangue significa IPD? (e non carriage?)

DNA di pneumococco può essere presente nel sangue di bambini sani?

---

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 1998, p. 669-673  
0095-1137/98/\$04.00+0  
Copyright © 1998, American Society for Microbiology

## Prospective Study To Determine Clinical Relevance of Detection of Pneumococcal DNA in Sera of Children by PCR

RON DAGAN,<sup>1\*</sup> OFRA SHRIKER,<sup>2</sup> INBAL HAZAN,<sup>2</sup> EUGENE LEIBOVITZ,<sup>1</sup> DAVID GREENBERG,<sup>1</sup>  
FRANCIS SCHLAEFFER,<sup>3</sup> AND RACHEL LEVY<sup>2</sup>

The assay was positive for all blood and cerebrospinal fluid culture-positive samples and for 38 and 44% of patients with lobar pneumonia and acute otitis media, respectively. It was positive for 17% of healthy controls.

---

end-point PCR

gene ply

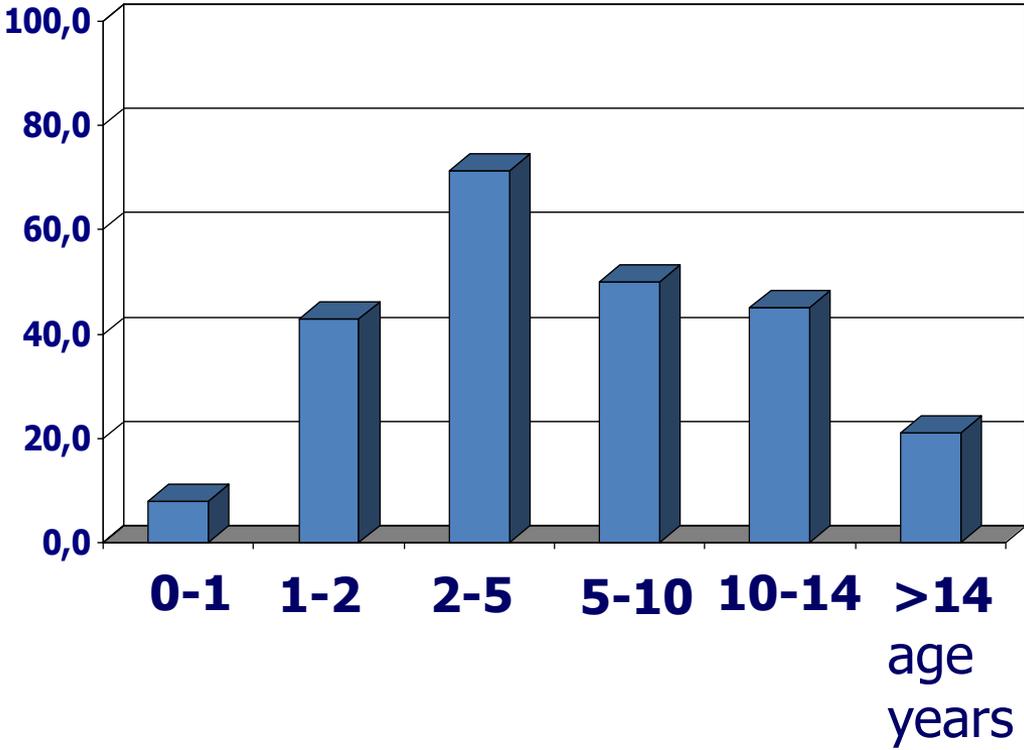
Siamo certi che trovare il DNA nel sangue significa IPD? (e non carriage?)

DNA di pneumococco può essere presente nel sangue di bambini sani?



**Real-time  
gene *lytA***

87 bambini/adolescenti **sani** → 42 carriers



**Atteso: 7/45 nel gruppo non-carrier  
13/42 nel gruppo carrier**

**Nessun  
campione di  
sangue (né da  
portatori né da non  
portatori) era  
positivo per DNA  
pneumococcico**



## Pneumococcal DNA is not detectable in the blood of healthy carrier children by real-time PCR targeting the *lytA* gene

Chiara Azzari, Martina Cortimiglia, Maria Moriondo, Clementina Canessa, Francesca Lippi, Federica Ghiori, Laura Becciolini, Maurizio de Martino and Massimo Resti

Department of Paediatrics, Anna Meyer Children's University Hospital, Florence, Italy

*J Med Microbiol. 2011 Jun; 60:710-4.*

Use of 2 pneumococcal com  
chain reaction assays in h

*Streptococc*

Nadine Rouphael<sup>a,b,\*</sup>, Sanet Steyn<sup>c</sup>, Mathieu  
Shabir A. Madhi<sup>e,f</sup>, Keith P. <sup>g</sup>, Edwin W. Ades<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, GA 30329, USA

<sup>b</sup>Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30303, USA

*Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 Aug; 70(4):452-4.*

La PCR nel sangue è  
negativa nei portatori sani.  
**PCR positiva = malattia.**

✦ dobbiamo occuparci del singolo paziente



✦ ma siamo parte della sanità pubblica



# Pneumococco e polmoniti in età pediatrica in Italia



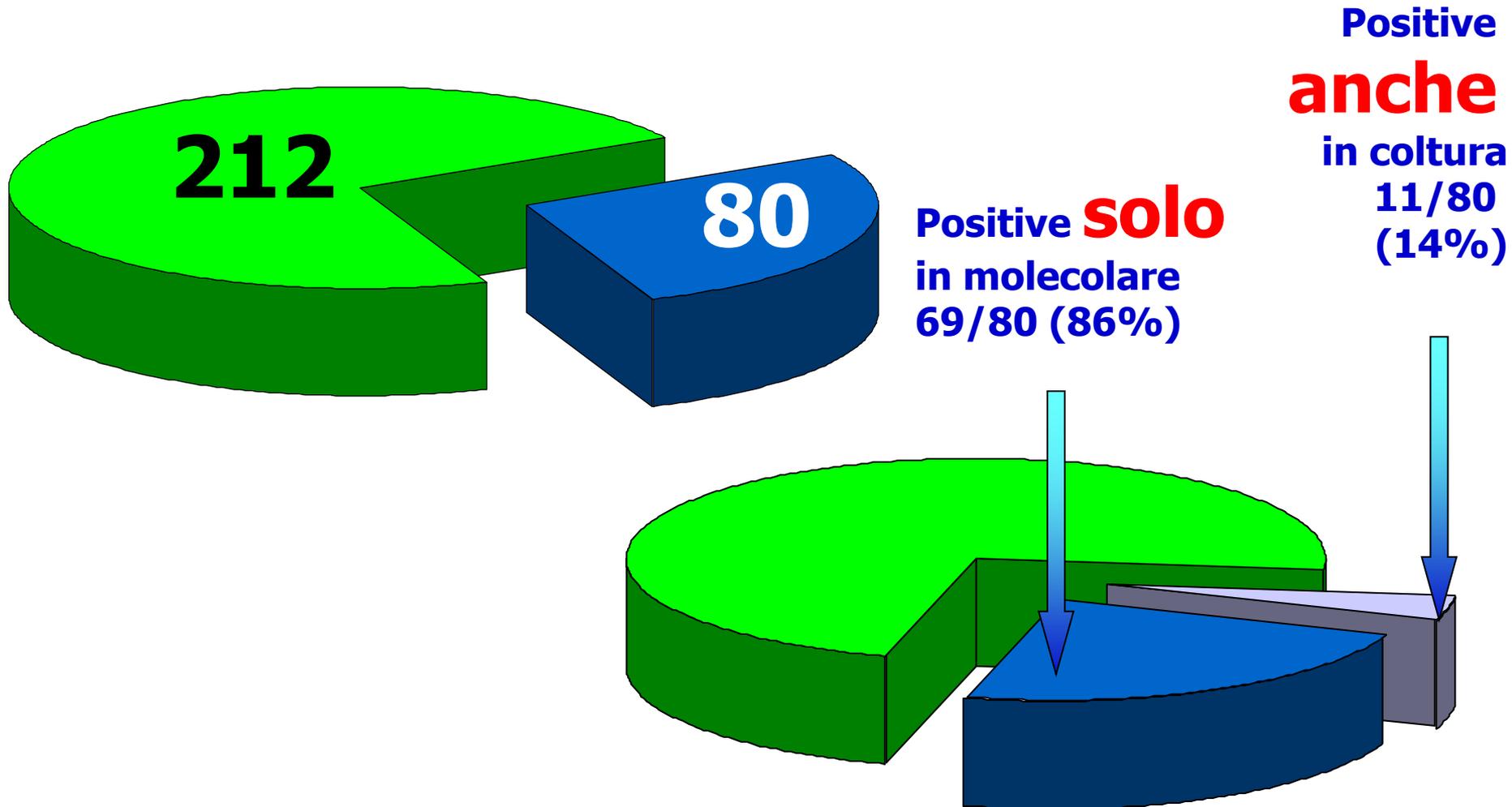
**753 polmoniti**

**da 19/20 regioni**

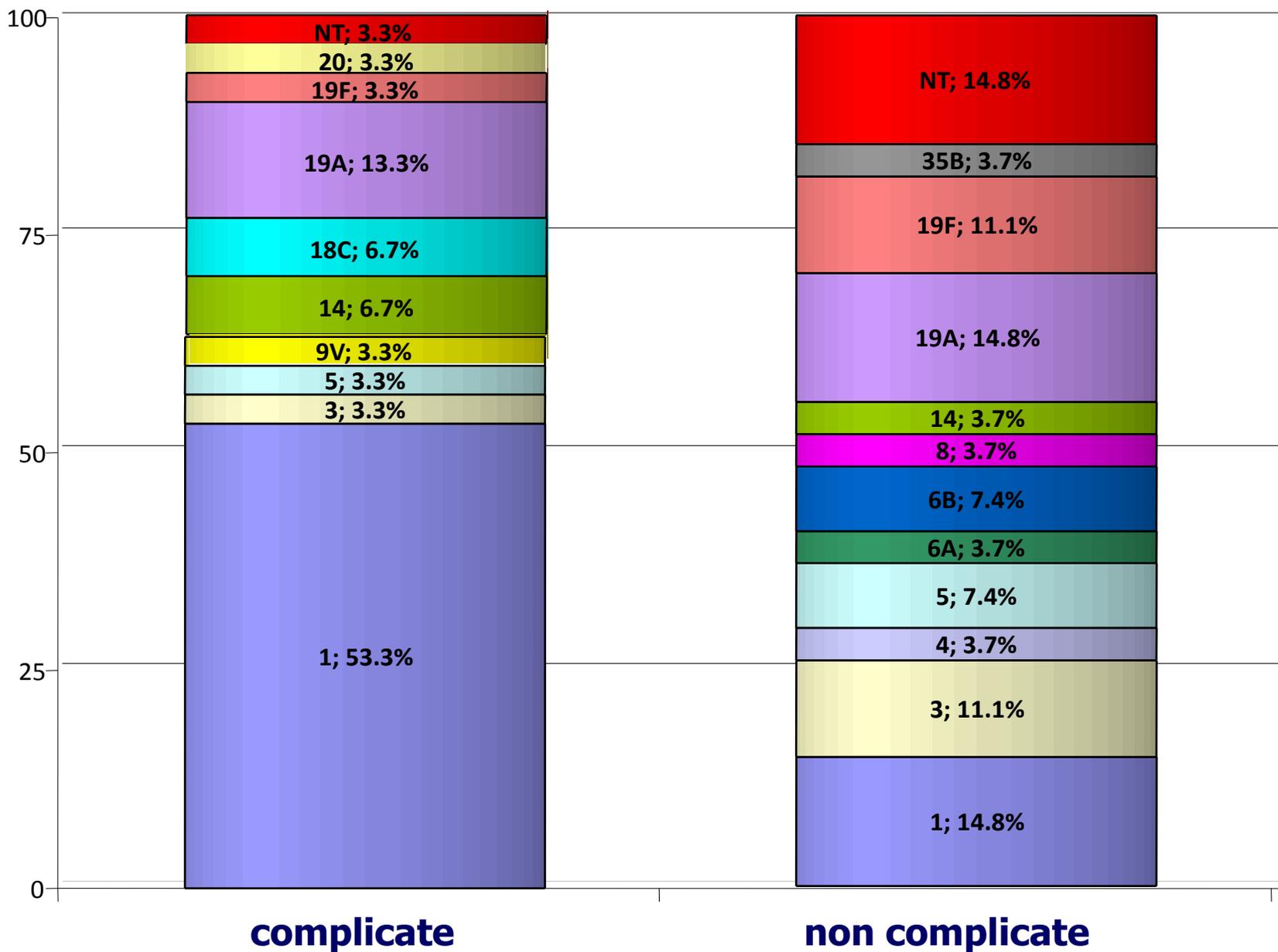
esclusa Val d'Aosta: 0.2%  
della popolazione pediatrica

**da 83 ospedali/reparti  
pediatrici**

# Quante ne avremmo trovate con la coltura?



# Distribuzione dei sierotipi di Pneumococco in polmoniti Correlazione con la presenza di complicanze



# Prevenzione delle malattie invasive pneumococciche:



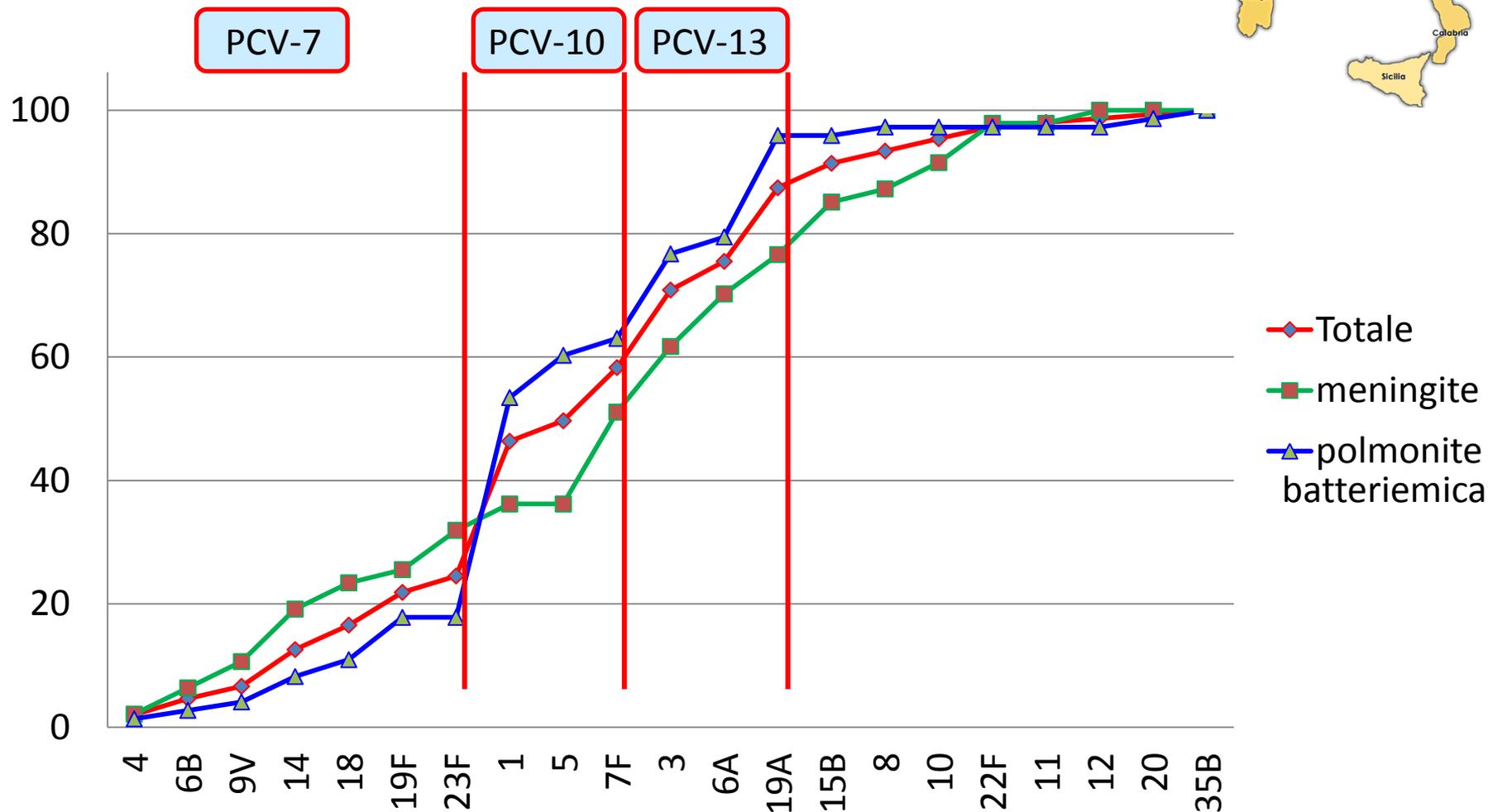
## Quale vaccino usare?

7-valente, 10-valente, 13-valente?

Non hanno lo stesso costo....

# Potenziale copertura di diversi vaccini PCV a seconda della malattia

(n=261; percentuale di tipizzati: 92%)





**dobbiamo occuparci del singolo paziente**



**ma siamo parte della sanità pubblica**



**E sui nostri dati si basano scelte di sanità pubblica**

**consapevoli e sostenibili**

**E' difficile?**

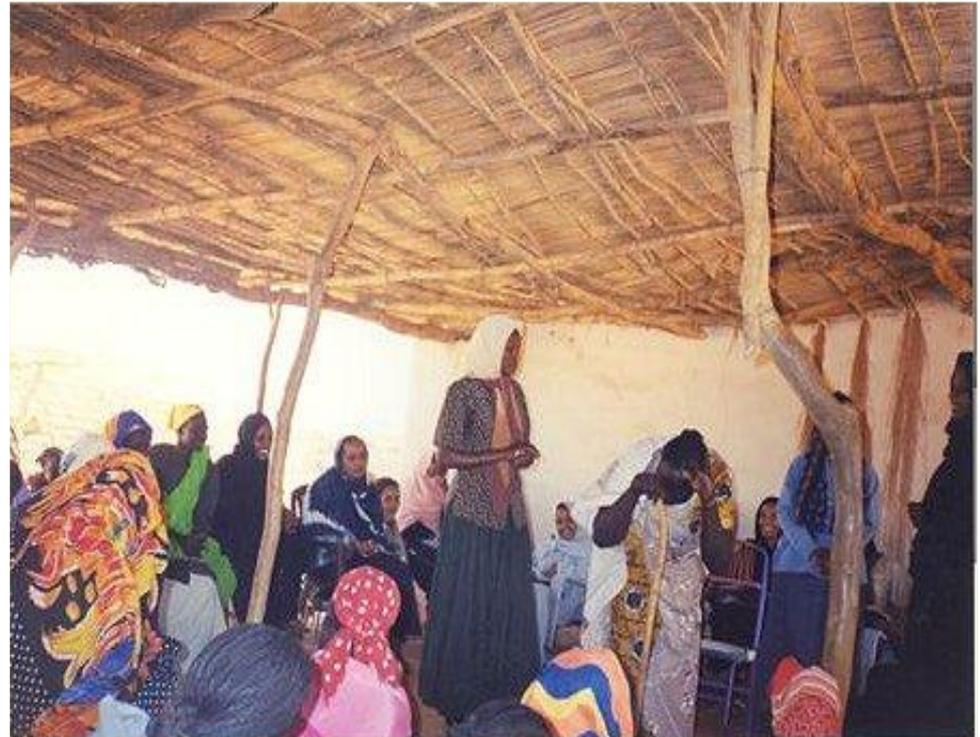


**E' costoso?**



**Il costo per la diagnosi di una malattia batterica invasiva mediante **Realtime PCR** è circa **1/3** del costo della coltura**

**Più di 80% delle meningiti possono essere diagnosticate **solo con metodi molecolari** in ospedali dei paesi in via di sviluppo**



# Quale metodo di diagnostica molecolare utilizzare?

★ PCR end-point (agarosio) *vs* Realtime

★ Primer specifici *vs* 16S

Evaluation of a commercial multiplex PCR test (SeptiFast) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections

*Josefson P. et al., Eur J Clin Microbiol. Infect Dis, 2011; 30:1127-1134*

|                 |                      | specificity    | NPV            | sensitivity | PPV        |
|-----------------|----------------------|----------------|----------------|-------------|------------|
| <b>Paragone</b> | <b>Staph.aureus</b>  | <b>&gt;97%</b> | <b>&gt;97%</b> | <b>67%</b>  | <b>43%</b> |
| <b>con</b>      | <b>Streptococcus</b> |                |                | <b>12%</b>  | <b>67%</b> |
|                 |                      |                |                | <b>43%</b>  | <b>23%</b> |

the low sensitivities and suboptimal PPVs noted in the present study discourage routine use of the test in its present form for the detection of community-onset bloodstream infections.

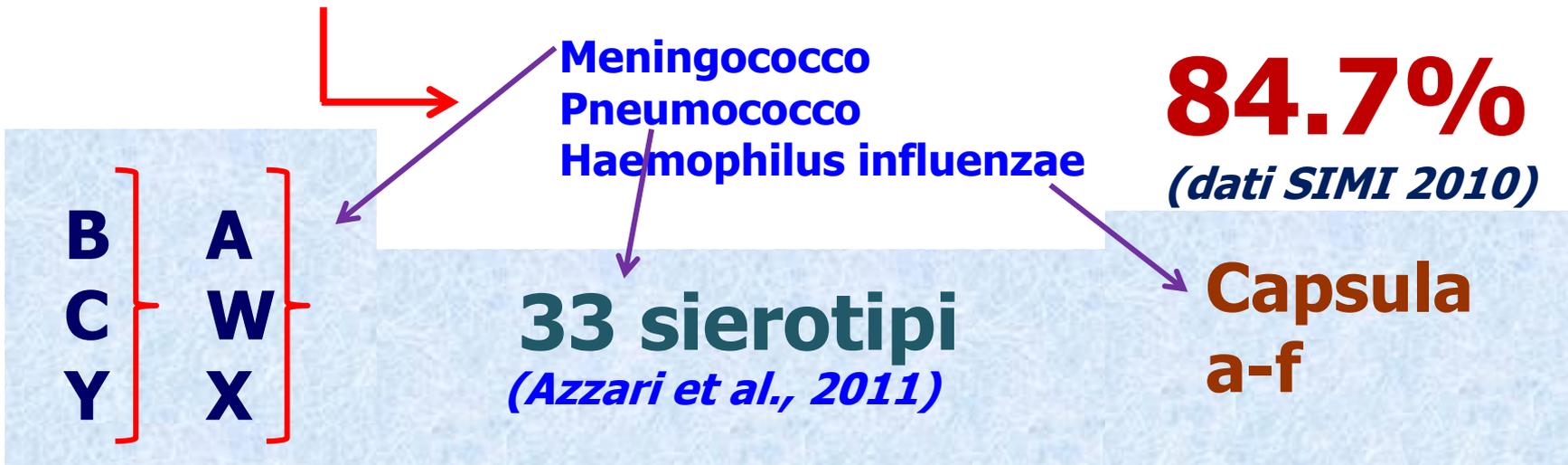
# Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens

Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 30333

Wang X et al., J Clin Microbiol Dicembre 2011

## La real-time è il metodo più sensibile

## Si possono testare più germi contemporaneamente (risparmiamo reagenti)



Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of IPD in Italian children.

*Azzari C, J Med Microbiol. 2008 Oct;57(Pt 10):1205-12.*

Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosing invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods. *Resti M, Clin Ther. 2009 Jun;31(6):1266-73.*

Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease

Common  
childr  
reacti

## PCR Real-time con primer specifici

- ★ Maggiore sensibilità
- ★ 100% specificità
- ★ 0% non tipizzati per meningococco
- ★ 5% non tipizzati per pneumococco (2011)



Potential of  
against invasive pneumococcal infection in Italian children.

*Azzari C, Resti M, et al., Vaccine 2012*



[www.meyer.it](http://www.meyer.it) - 055/5662542