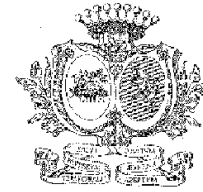




Sede legale: Viale Giolitti, 2
15033 Casale Monferrato (AL)



Direzione Sanità
Settore Promozione della Salute e
Interventi di Prevenzione Individuale e
Collettiva
sanita.pubblica@regione.piemonte.it



Azienda Ospedaliero-Universitaria
San Giovanni Battista di Torino

IL RUOLO DEL LABORATORIO DI RIFERIMENTO REGIONALE

Anna Barbui

S.C. Microbiologia AOU San Giovanni Battista di Torino



Workshop

Sorveglianza della Malattie Batteriche Invasive

Roma 28-29 febbraio 2012

Obiettivi della sorveglianza delle malattie batteriche invasive

Dal “*Regione Piemonte....Protocollo operativo*” luglio 2008

Obiettivi generali:

Stimare la quota dei casi prevenibili e valutare l’impatto delle strategie intraprese

Attivare a livello nazionale la sorveglianza di tutte le malattie batteriche invasive causate da meningococco, pneumococco ed emofilo garantendo la sierotipizzazione della maggior parte degli isolamenti

Obiettivi specifici:

✓ Monitorare l’andamento temporale e geografico dei casi

✓ Descrivere la frequenza dei casi per agente patogeno, regione e fascia di età

✓ Descrivere la distribuzione dei sierogruppi/sierotipi circolanti

✓ Stimare la quota di queste infezioni invasive prevenibili da vaccino

✓ Indagare i casi di fallimento vaccinale, studiandone i fattori di rischio

“Il ruolo del laboratorio di microbiologia nel contesto della sorveglianza delle meningiti batteriche”

Laboratorio ospedaliero:

- sospetta meningite: esame chimico- fisico del liquor
- conferma eziologica:
 - esame microscopico
 - ricerca antigeni
 - esame colturale del liquor
 - emocoltura

Per un'ottimale attuazione del sistema di sorveglianza è cruciale potenziare le capacità di laboratorio in sede periferica

Laboratorio di riferimento Regionale:

Sierotipizzazione ceppi batterici isolati
Indagini molecolari per ricerca agenti eziologici

Laboratorio di riferimento Nazionale:

Tipizzazione ceppi batterici
Studi epidemiologici su vasta scala

Diagnosi di laboratorio delle meningiti: Il punto cruciale

Prelievo del liquor (LCR) prima dell'inizio della terapia antibiotica

Prelievo di sangue per emocoltura

Invio tempestivo in laboratorio



- LCR è ipotonico: lisi dei neutrofili (- 32% dopo 1 ora)
- NM, SP e HI sono batteri “fastidious” e possono non sopravvivere a variazioni di temperatura
- Gli antigeni polisaccaridici possono degradarsi rapidamente a temperatura $>25^{\circ}\text{C}$

Diagnosi microbiologica delle meningiti

Esame colturale del liquor

Tableau 11

Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives négatives et positives de la culture du LCR dans les syndromes méningés.

Sensitivity, specificity, and predictive value (positive and negative) of CSF culture in meningeal syndromes.

Auteur	Ref	Inclusion	Culture ±	Se	Sp	VPP	VPN
Pusponogoro et al.	[9]	16	6-Nov	55	100	100	50
Surinder et al.	[29]	65	15/50	78	98	94	92
Marcos et al.	[30]	57	13/25	53	100	100	73
Dunbar et al.	[12]	2635	284/2351	94	91	23	99.8
Saravolatz et al.	[21]	74	15/74	88	98	94	97
Van Gastel et al.	[22]	37	Nm : 4/23 Spn :5/14	17 36	100 100	100 100	71 86
Bryant et al.	[64]	24	15/24	63	100	100	100
Richardson et al.	[23]	38	21/38	55	100	100	93

Inclusion : nombre d'échantillon de l'étude ; Gram ± : nombre d'examen de la coloration de Gram positif/negative ; culture ± : culture positive/negative ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive negative ; Nm : *N. meningitides* ; Spn : *S. pneumoniae*.

E. Carbonelle, MEDMAL feb 2009

Trattamento antibiotico	sensibilità
NO	36-94%
SI	<10%

EMOCOLTURA +

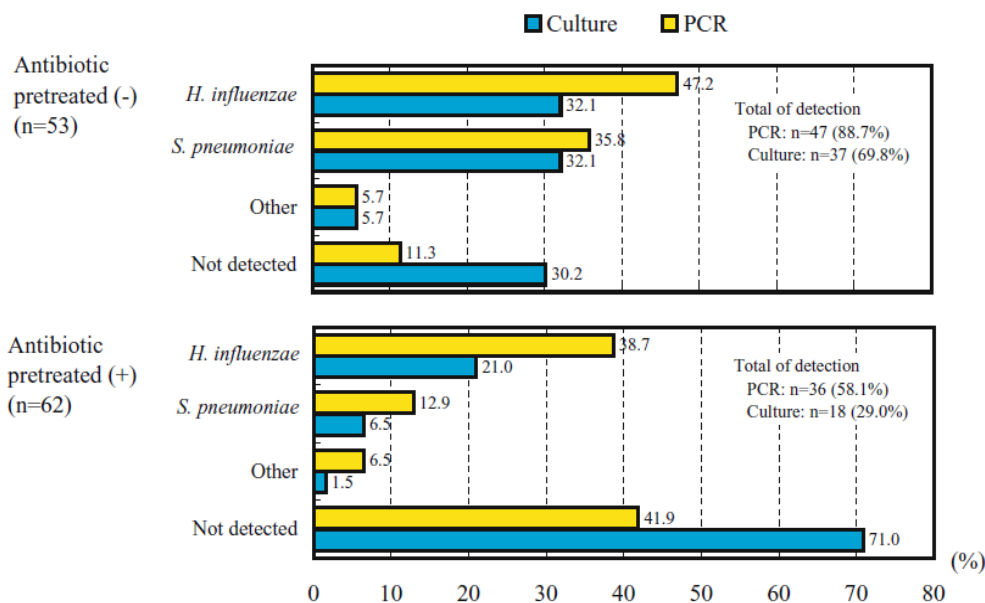
pre trattamento 50- 60 %
post trattamento < 5 %

LA PCR E DIAGNOSI DI MENINGITE BATTERICA

VANTAGGI

- Rapidità (tempi diagnostici ridotti)
- Elevata specificità
- Elevata sensibilità
- Buona riproducibilità
- Meno dipendente dalla terapia

97



PCR
pre ATB: **88.7%**
post ATB: **58.1%**

Coltura
pre ATB: **69.8%**
post ATB: **29%**

Fig. 1. Influence of prior antibiotics on the detection of causative pathogens by real-time PCR or culturing

LA PCR NELLA DIAGNOSTICA CLINICA CRITICITA'

- Costi
- Formazione del personale
- Organizzazione del laboratorio



Identificare pochi centri dove effettuare questo tipo di indagini

Diagnosi di laboratorio delle meningiti: I punti FONDAMENTALI

- corretta raccolta dei campioni clinici
- non esiste un esame di laboratorio con affidabilità, rapidità, sensibilità, specificità ottimali

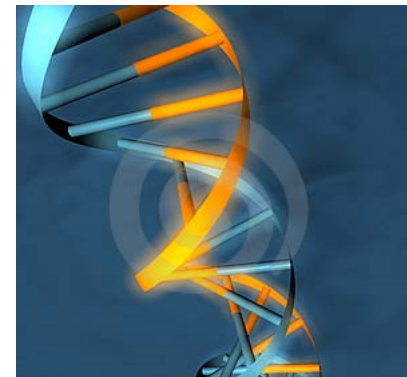
UTILIZZARE SEMPRE TUTTI I TEST DI LABORATORIO DISPONIBILI:

Esame chimico- fisico
Esame microscopico
Esame colturale (liquor e sangue)
Ricerca antigeni (liquor e urina)
PCR (in laboratori adeguatamente attrezzati)

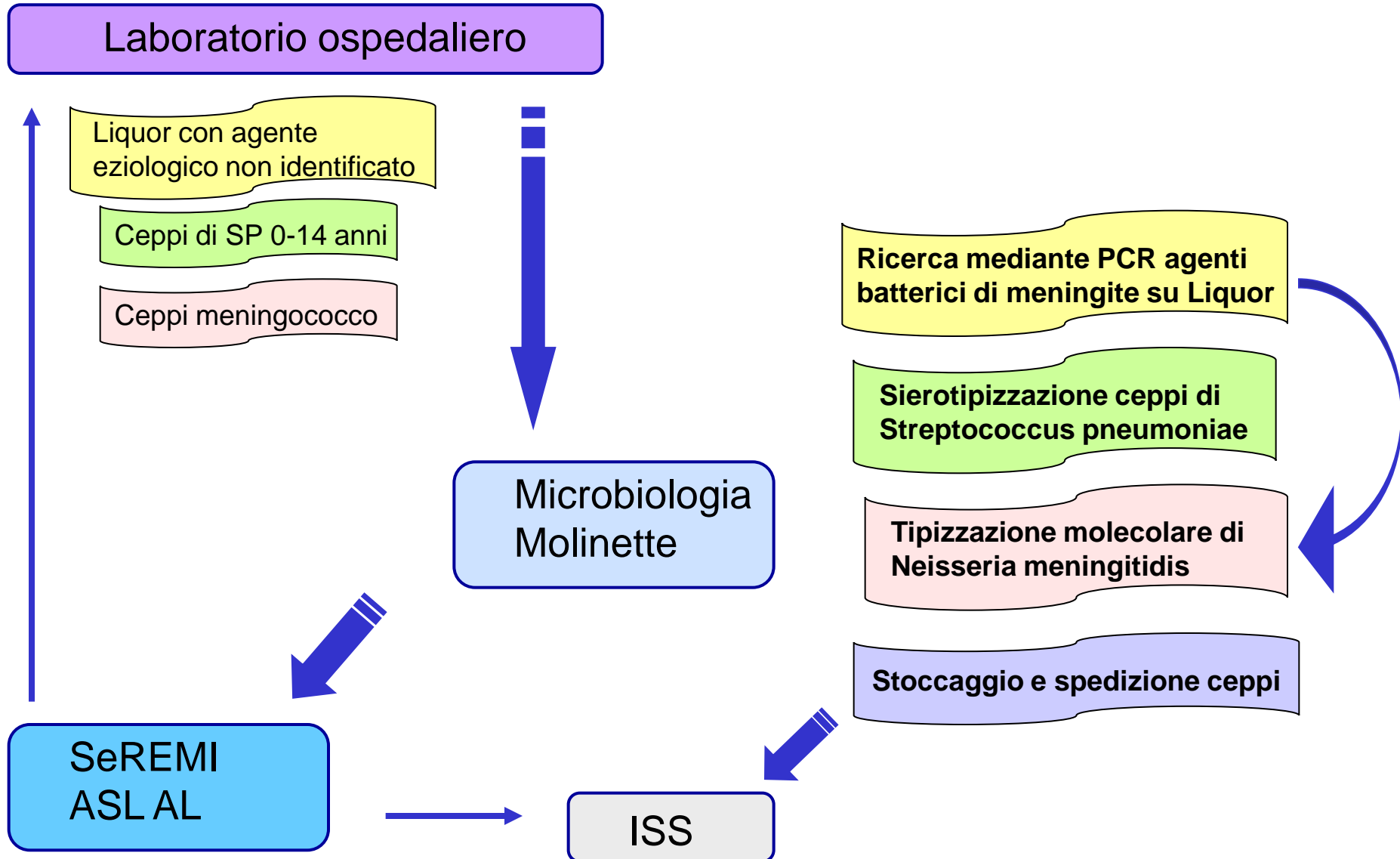
“tutte le metodiche in PCR per target batterici devono essere considerate di impiego esclusivamente epidemiologico mancandone l'adeguata validazione clinica”. (PDM AMCLI 2008)



- **Laboratorio di riferimento regionale:
SC Microbiologia, ASOU San Giovanni Battista**
- **Diagnosi biomolecolare e tipizzazione ceppi batterici
(attività senza supporto finanziario aggiuntivo)**



ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista



Ricerca del DNA batterico con PCR: Kit Real time PCR multiplex

- Sistema EuSepScreen = 2 kit in REAL TIME PCR
- Sistema validato per diagnostica (CE-IVD):
- I risultati sono disponibili in poche ore (no urgenza)

EuSepScreen

N. meningitidis (ctra-FAM)
S. pneumoniae (lytA-JOE)



H. influenzae (bexA-JOE)
Adenovirus (L4 - FAM)



Beta globina (pUC57-FAM)



EuSepScreen lattanti

E. coli (uidB-JOE)
K. pneumoniae (phoE-FAM)



S. agalactiae (sip-FAM)
L. monocytogenes (iap-JOE)



Beta globina (pUC57-FAM)

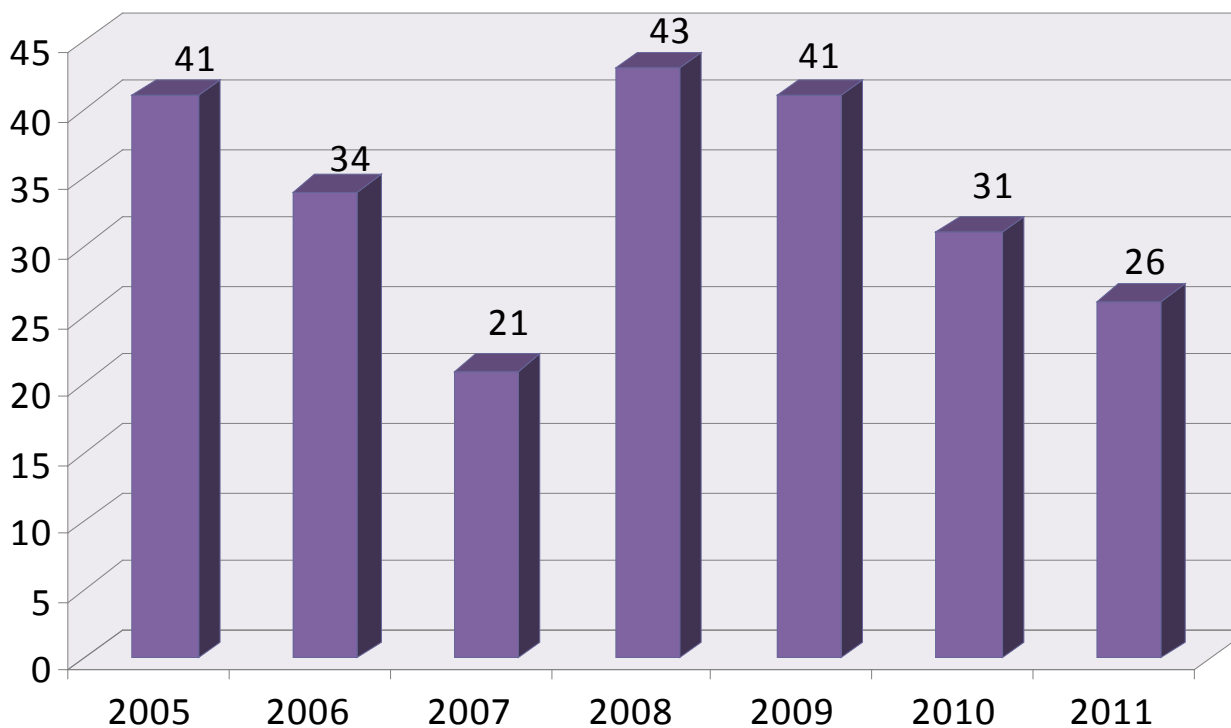


Test aggiuntivi:

- ✓ Identificazione *H. influenzae* sierotipo non B
- ✓ Sequenziamento DNA batterico (specie diverse)
- ✓ Ricerca MTB-DNA
- ✓ Ricerca DNA batterico da sangue (da marzo 2012)

ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

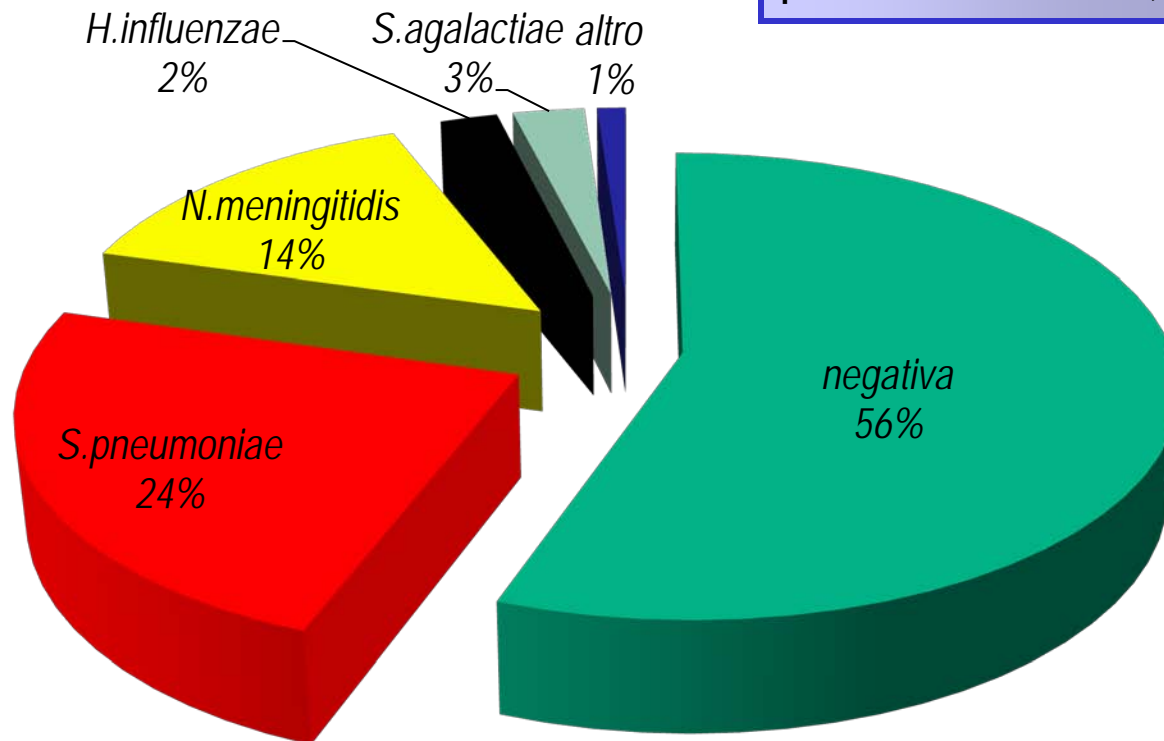
Da gennaio 2005 a dicembre 2011: 235 campioni di liquor



ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

Da gennaio 2005 a
dicembre 2009:
180 campioni di liquor

- 126 liquor negativi con tutti i test microbiologici convenzionali
- 54 LCR con diagnosi eziologica presuntiva: Gram, Ag, Emocoltura

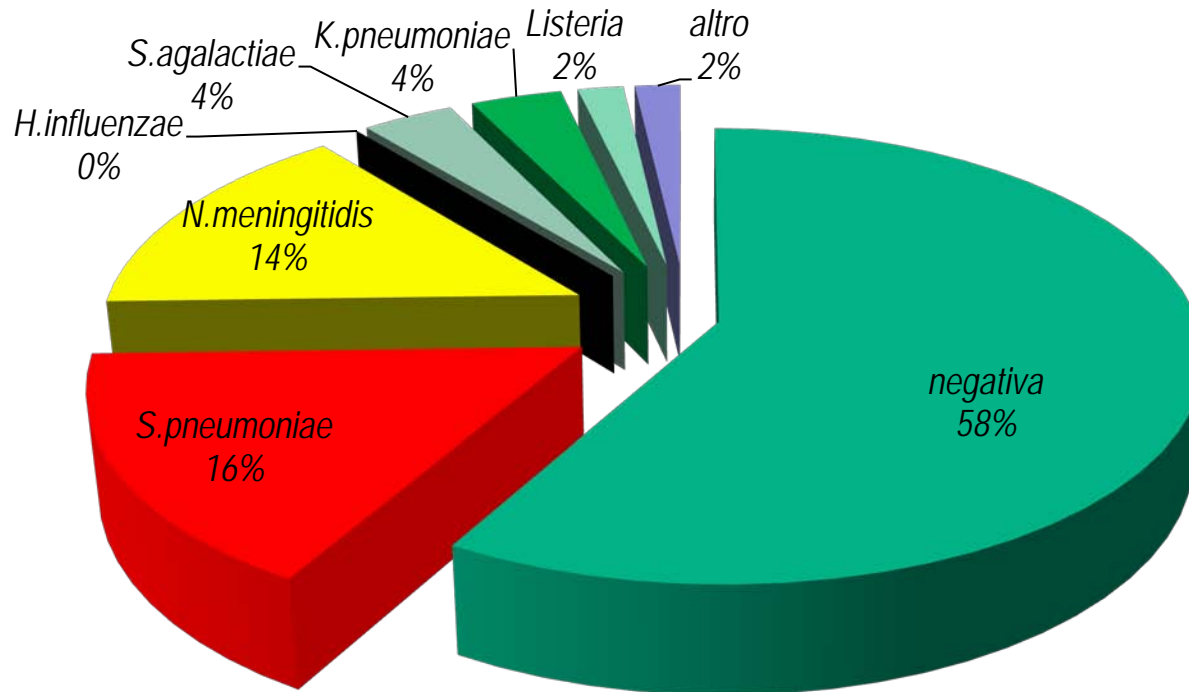


con PCR: Diagnosi/Conferma nel 44%

ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

Da gennaio 2010 a
dicembre 2011:
55 campioni di liquor

- 47 liquor negativi con tutti i test microbiologici convenzionali
- 8 LCR con diagnosi eziologica presuntiva: Gram, Ag, Emocoltura



con PCR: Diagnosi/Conferma nel 41.8%

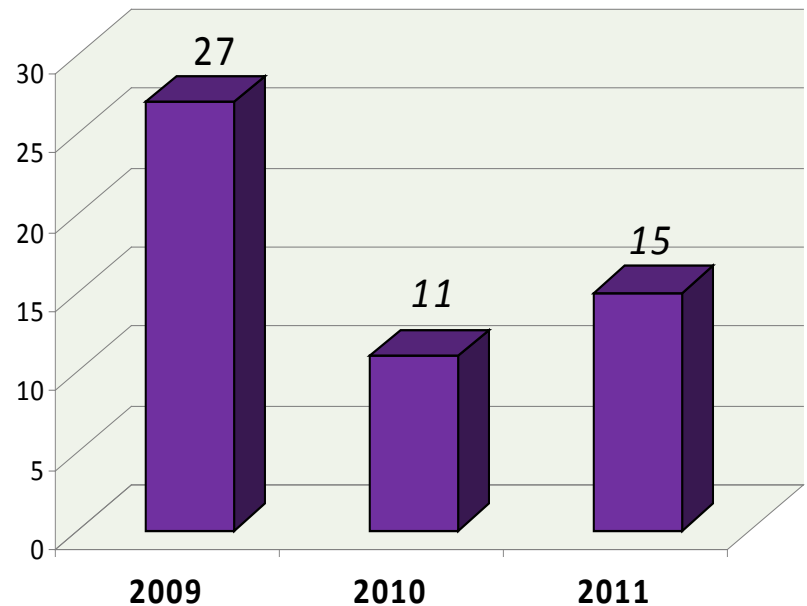
ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

Tipizzazione molecolare di *Neisseria meningitidis*:
PCR multiplex da campione o da ceppo

- Identificazione/conferma di *N. meningitidis* gene ***crgA***
- Identificazione dei sierogruppi
 - ➔ A gene ***orf-2***
 - ➔ B, C, Y, W-135 gene ***siaD***

Da gennaio 2009:
53 Tipizzazioni

➤ Ceppi NM	38
➤ Liquor con PCR +	15

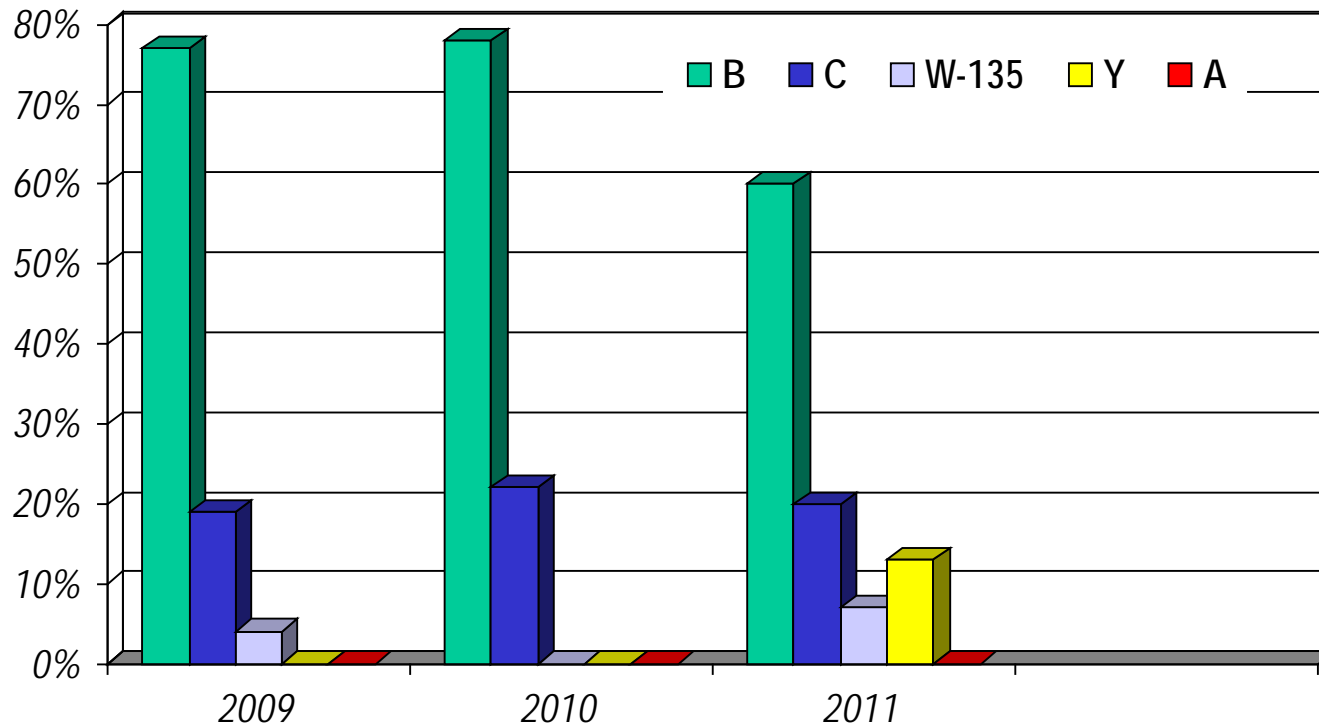


ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

Tipizzazione molecolare di *Neisseria meningitidis*

Da gennaio 2009: 53 Tipizzazioni

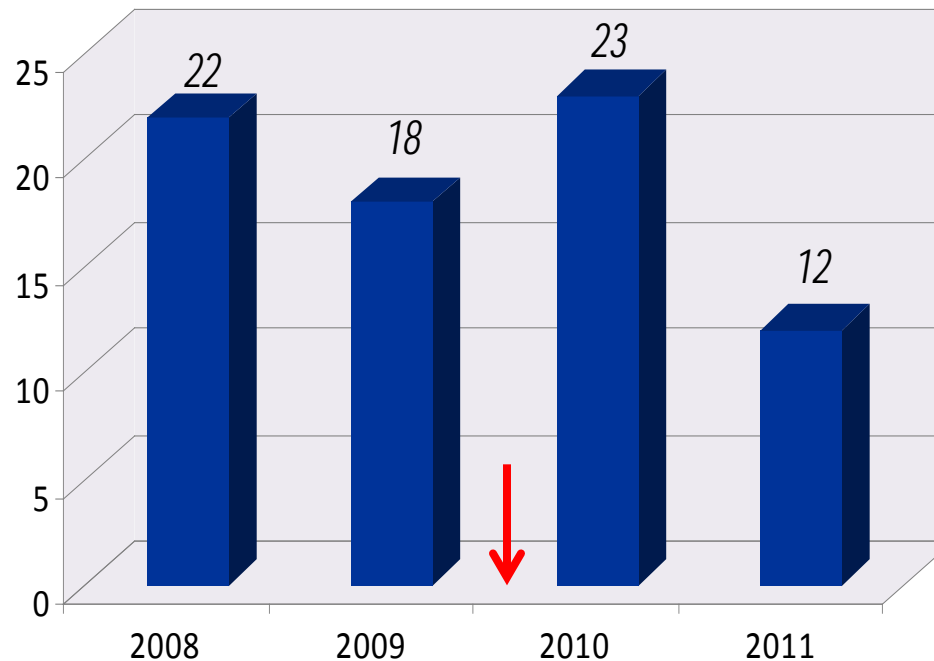
- Ceppi NM 38
- Liquor con PCR + 15



ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

Sierotipizzazione ceppi di *Streptococcus pneumoniae*

- ❑ Sierotipizzazione di ceppi di *S. pneumoniae* isolati da sangue o liquor in pazienti da 0 a 14 anni di età
- ❑ 29 Laboratori ospedalieri
- ❑ 75 ceppi isolati nel periodo novembre 2007 – dicembre 2011

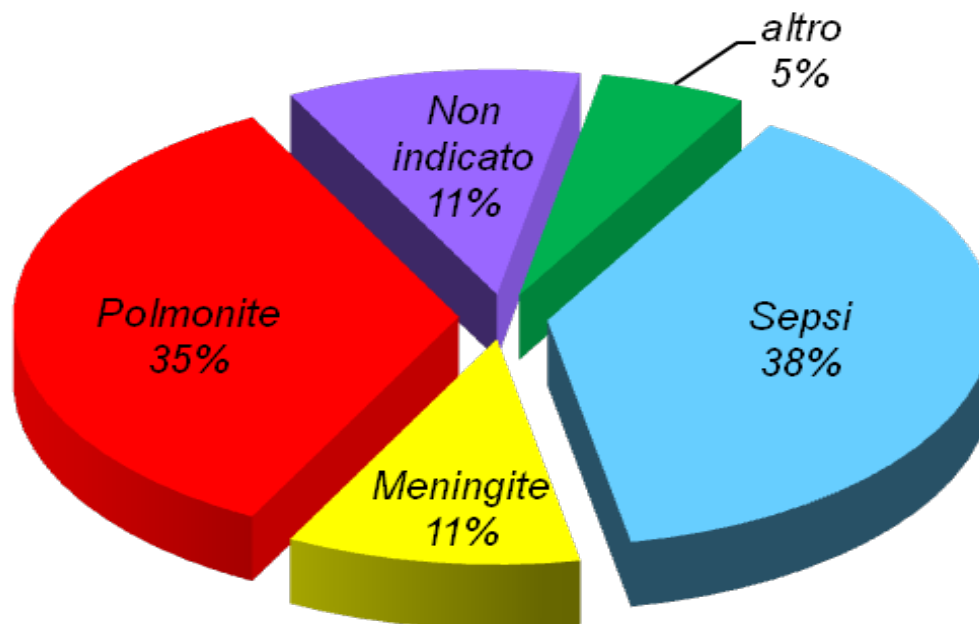


ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

Sierotipizzazione ceppi di *Streptococcus pneumoniae*

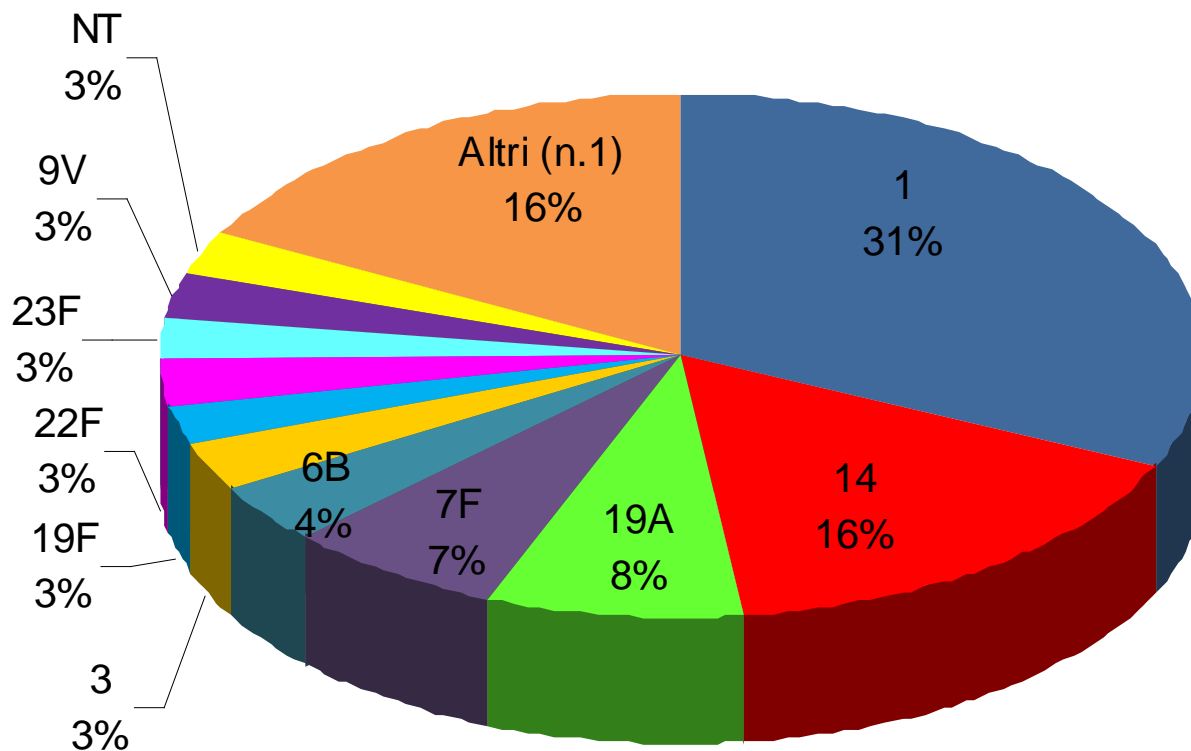
➤ Sangue	67
➤ Liquor	5
➤ Altro	3

Infezioni invasive da S. pneumoniae 2007-2011



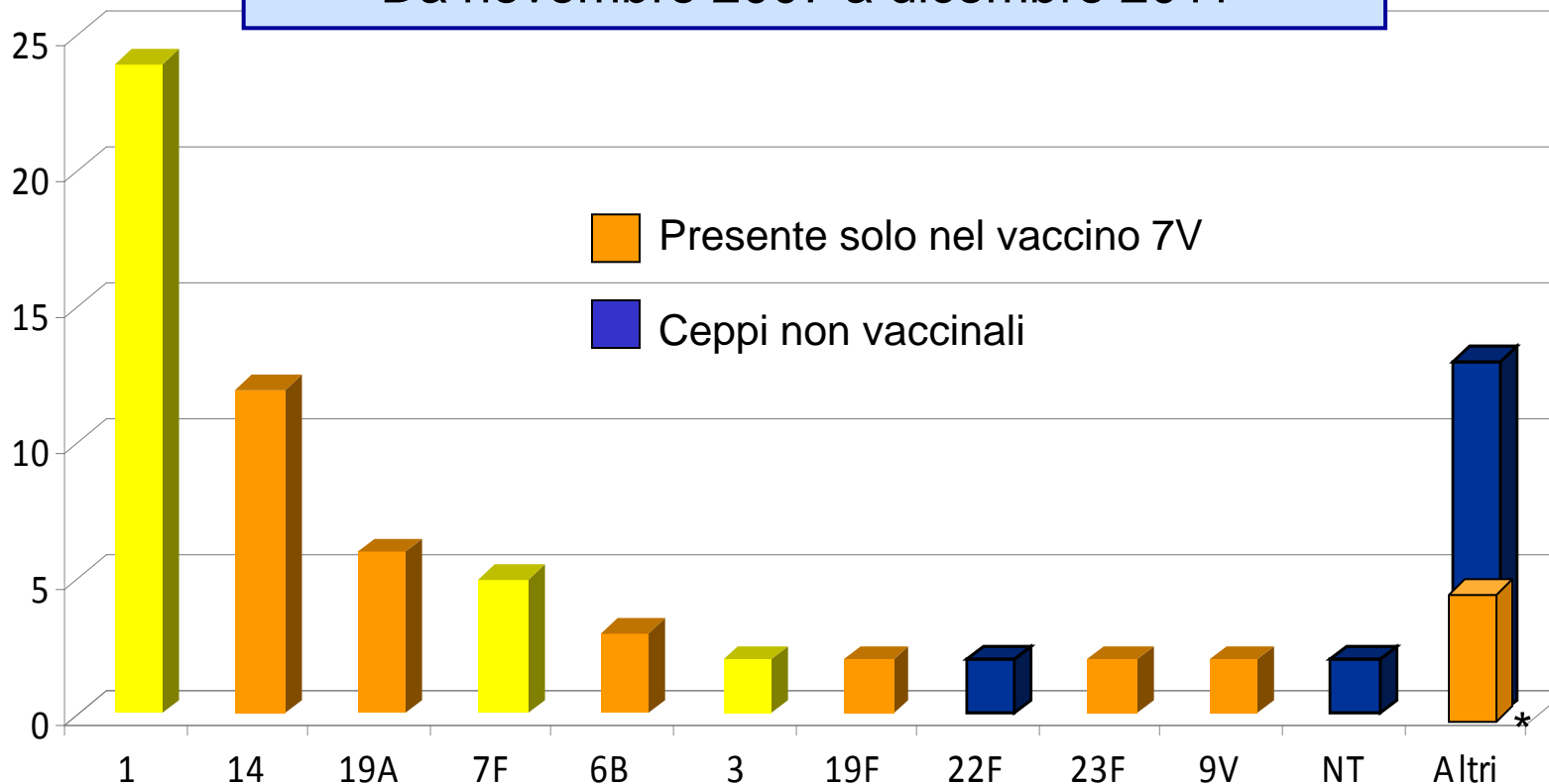
ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

Ceppi di *Streptococcus pneumoniae* identificati
Da novembre 2007 a dicembre 2011



ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

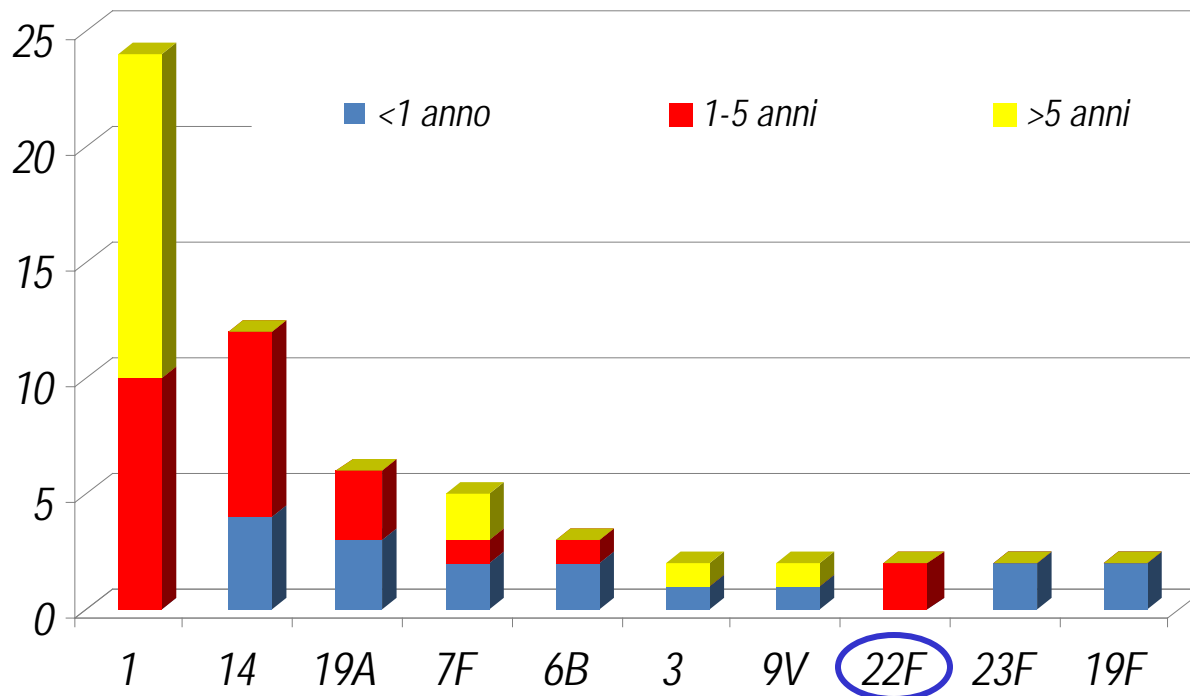
Ceppi di Streptococcus pneumoniae identificati
Da novembre 2007 a dicembre 2011



*Altri: 1 solo isolamento per i sierogruppi: 5, 6A, 8, 7B/C, 15A, B e C, 18F, 19F, 23A e B, 33D e F

ATTIVITA' DEL LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

Ceppi di *Streptococcus pneumoniae*
Suddivisi per fasce di età



Criticita' e Conclusioni

CLINICI

DIALOGO

ISTITUZIONI

LABORATORI OSPEDALIERI

LABORATORI DI RIFERIMENTO

- Corretta raccolta dei campioni clinici
- Rafforzare il ruolo dei laboratori nella diagnosi eziologica
- Corretta gestione dei campioni da inviare per analisi successive

Criticita' e Conclusioni

LABORATORIO REGIONALE DI RIFERIMENTO
S.C. Microbiologia A.S.O.U. San Giovanni Battista

DISPONIBILITA'

- Rispondere alle esigenze dei clinici e dei laboratoristi
- Valutazione delle problematiche della sorveglianza epidemiologica
- Adesione a nuovi progetti di sorveglianza

MIGLIORAMENTO

- Supporto diagnostico ai laboratori periferici:
 - PCR su liquor: passaggio da un servizio di supporto epidemiologico ad un supporto di tipo diagnostico con TAT di 24 ore con test molecolari validati
 - Identificazione mediante tecniche molecolari da ceppo o da campione di altri patogeni
 - Diagnosi rapida di sepsi: ricerca DNA da sangue
- Adattamento alle nuove esigenze diagnostiche ed epidemiologiche



Dir. Roberto Serra
Medici, Biologi, Tecnici e tutto lo staff
Tutti i laboratori regionali
Seremi Regione Piemonte
ISS