

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Le urgenze infettive in medicina interna: confronto tra internista e microbiologo

R. Brugiolo

Direttore Dip. Medicina
Direttore UOC Geriatria



S. Grandesso

Resp SSD Microbiologia
Dip. Patologia Clinica

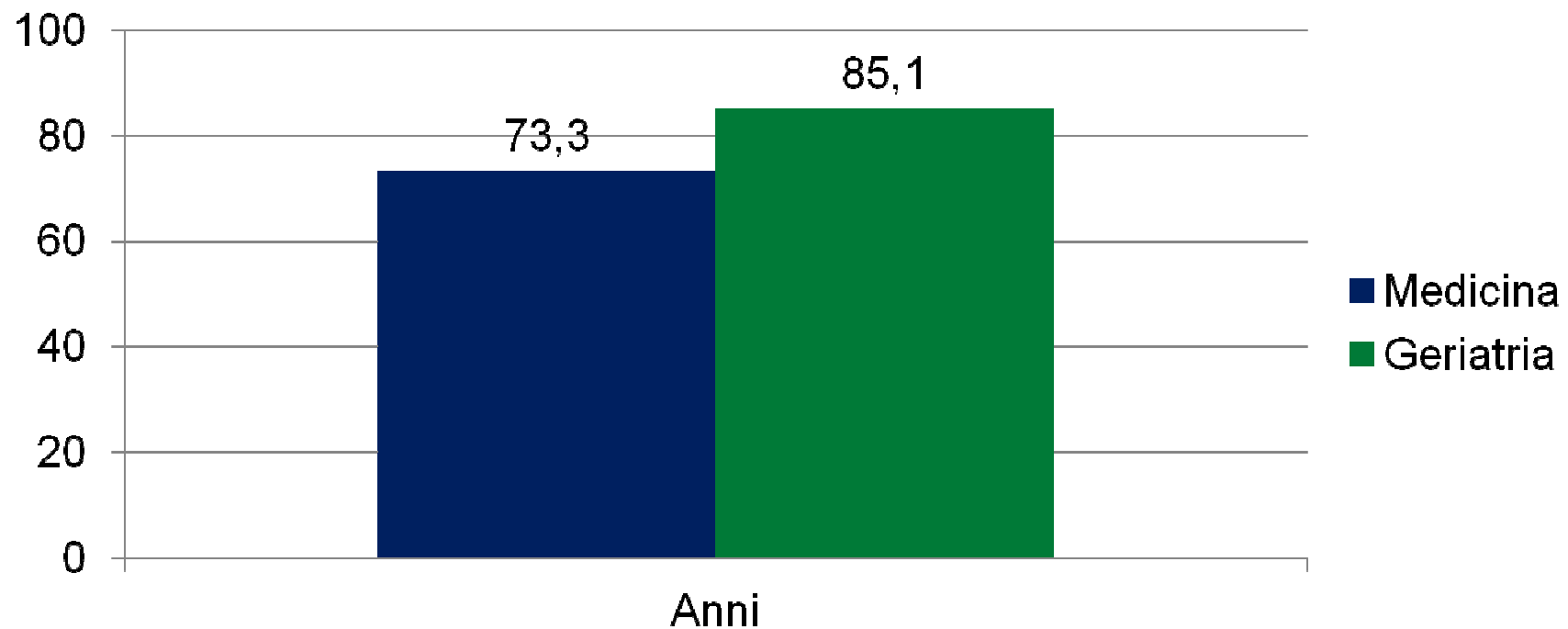


Ospedale dell'Angelo
Mestre





Età media pazienti ricoverati Ospedale dell'Angelo - Mestre



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



...The need for speed in medicina

- Diarrea nell'anziano



Definizione di Diarrea

Frequenza dell'alvo > 3 volte/die
Peso fecale > 200g/die
Urgenza*/Emissione feci liquide*

* Talley, Gastroenterology 1992;102:895-901
Hoffmann, Best Pract Res Clin Gastroenterol 2002; 16: 17-36



Definizione e Classificazione per durata del disturbo



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



IL PROGETTO S.O.F.I.A: FIRI - SIGG

24 UO Geriatria/133 MMG

5515 pazienti ambulatoriali

Età media: 75.0 ± 6.2 anni

range: 65-100 anni

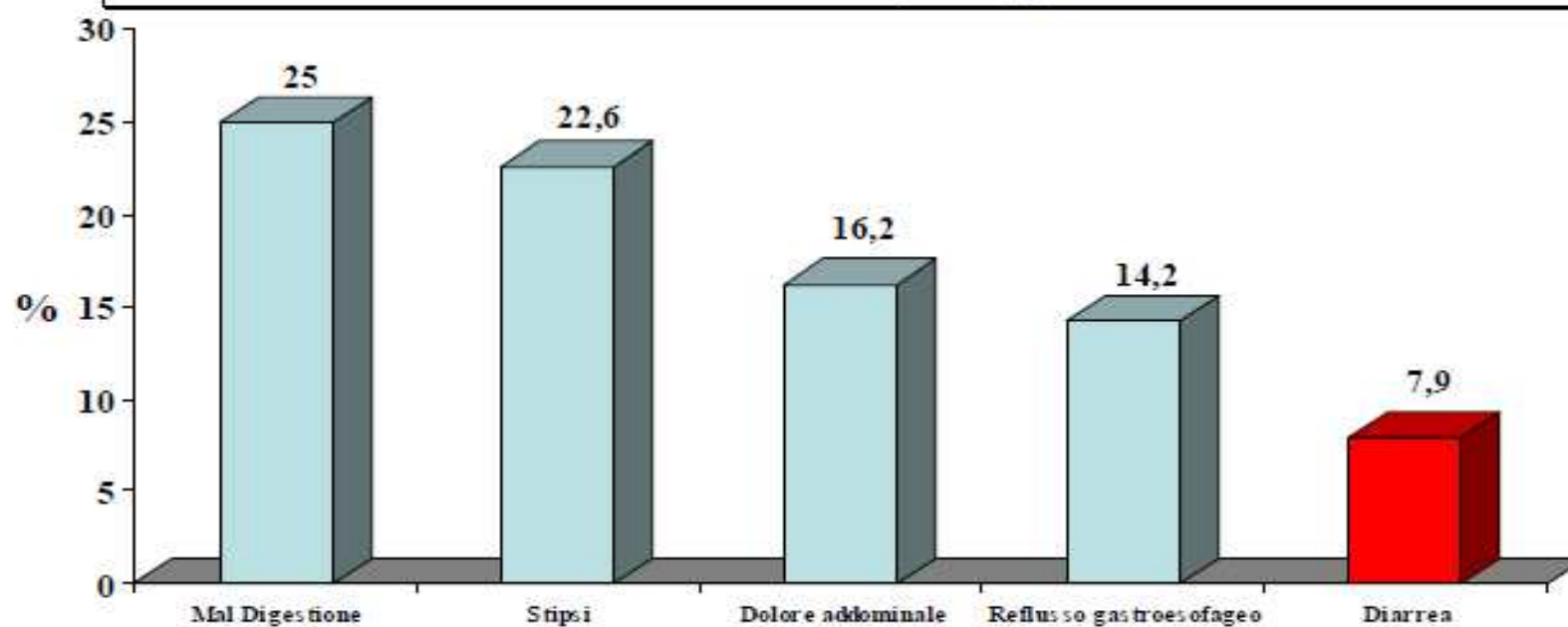


3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Prevalenza dei Sintomi Gastrointestinali

24 UO Geriatria/133 MMG, 5515 anziani ambulatoriali
Età media: 75.0 ± 6.2 anni, range: 65-100 anni

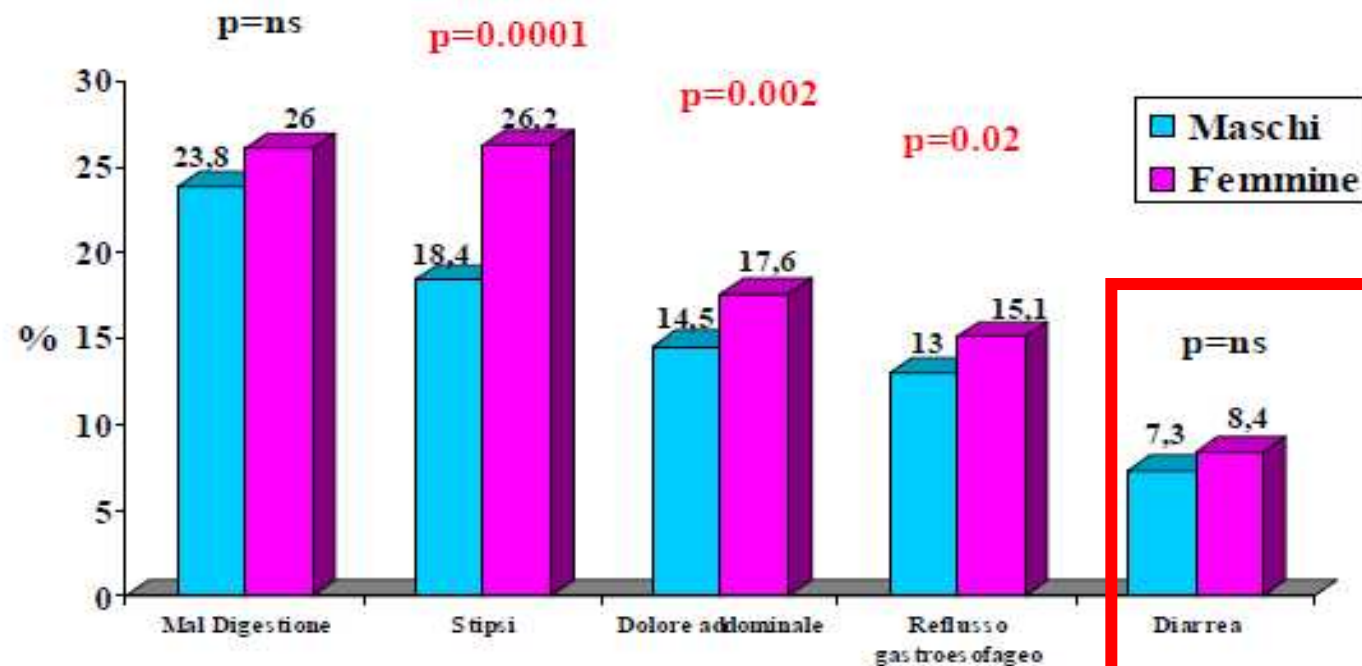


SOFIA Project, 2007

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Sintomi Gastrointestinali in anziani divisi per sesso



SOFIA Project, 2007

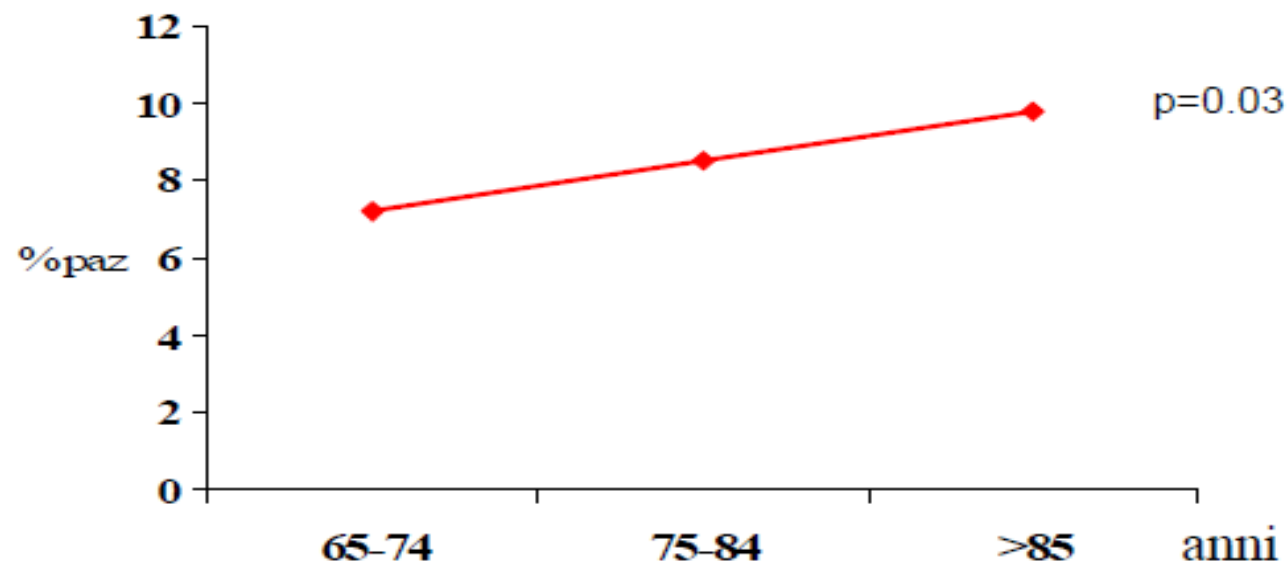
3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Progetto SOFIA
FIRI - SIGG

Prevalenza di diarrea in soggetti anziani divisi per età

423 pazienti con diarrea (GSRS score ≥ 2)
M=178, F=245, età media=75.0 $\pm$ 6.3 anni, range=65-100 anni

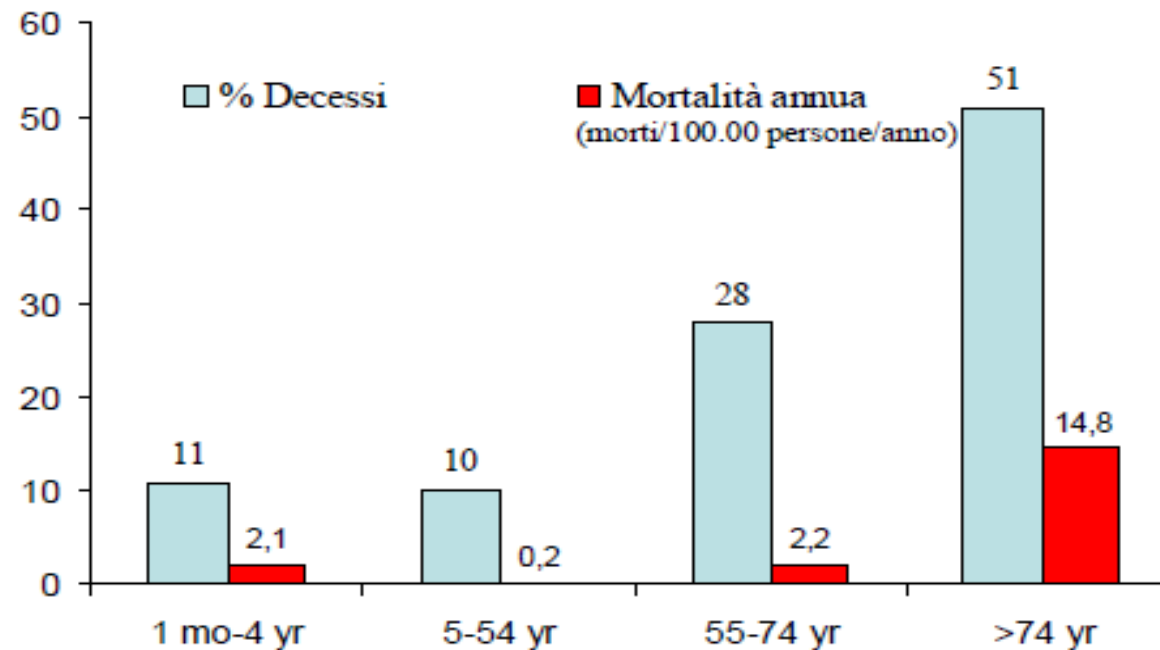


SOFIA Project, 2007



Diarrea nell'anziano: epidemiologia

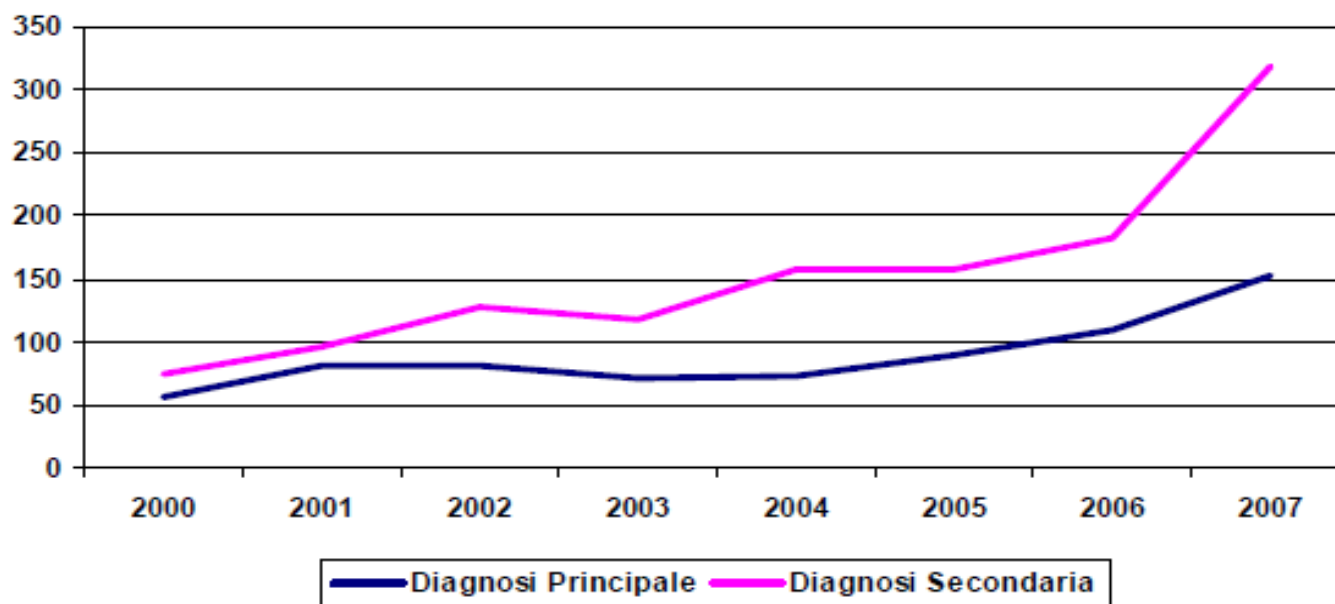
Mortalità per diarrea (28.538 soggetti, periodo 1979-1987, USA)





Prevenzione CDAD: le conoscenze disponibili ospedale

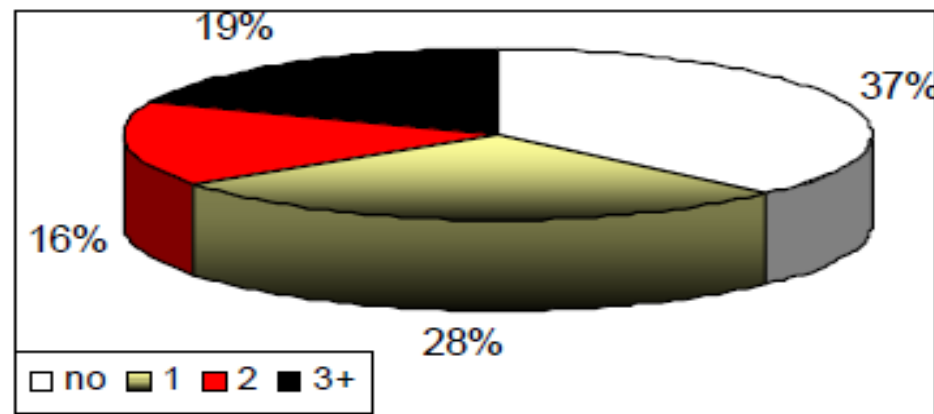
Andamento delle dimissioni con segnalazione di infezione intestinale da C. difficile
in diagnosi principale e secondaria della SDO
anni 2000-2007
ICD9-CM:008.45





Prevenzione Health Care Acquired Infection sistema residenziale del Veneto:utilizzo degli antibiotici

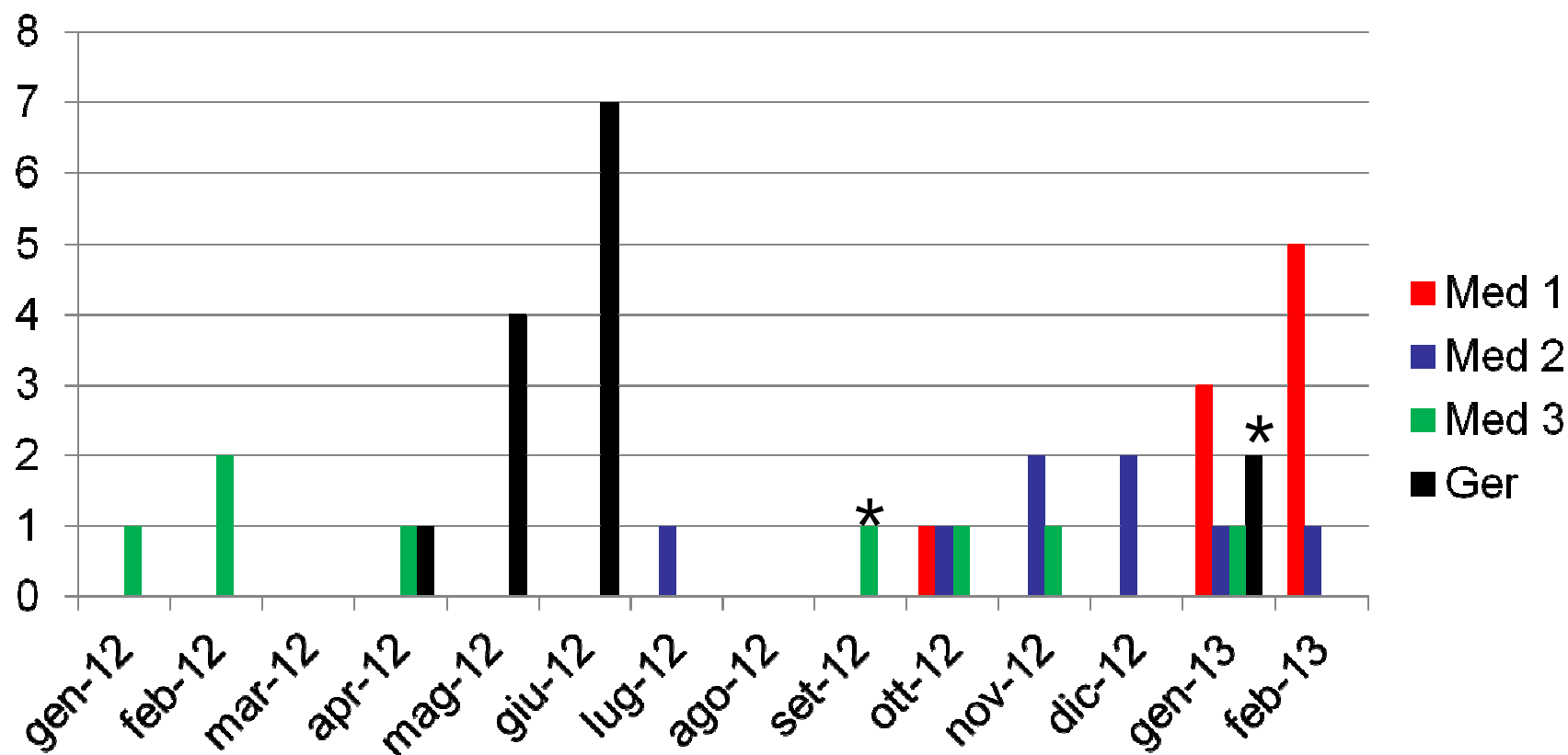
numero di cicli di terapia antibiotica sistemica negli ultimi 12 mesi



Molecole più utilizzate: fluorochinoloni e cefalosporine



C. difficile pos Medicine Mestre



222 campioni testati : 42 positivi (18.9%)

*: tossina binaria



Clostridium difficile Patologia

- Patogeno intestinale
 - diarrea
 - molto frequente, non grave
 - colite
 - colite pseudomembranosa
 - rara, molto grave
- Occasionalmente implicato in infezioni extraintestinali

antibiotico
associata



C. difficile-associated disease CDAD

Patogeno intestinale

- diarrea → colite → colite pseudomembranosa
- complicazioni
 - perforazione, megacolon tossico, sepsi

Si presenta con

- diarrea, dolore addominale, febbre
- leucociti fecali, leucocitosi

In grande maggioranza CDAD in soggetti

- degenti o ex degenti
- abbiano assunto o stiano assumendo antibiotici



C. difficile virulenza e patogenicità

Tossina A

Tossina B

Tossina binaria

proteasi, fimbrie, flagelli, capsula

differenze nella espressione dei vari fattori
variabilità nella virulenza e patogenicità



C. difficile patogenicità

Patogenicità associata alle due tossine A e B

- Si riteneva che *Cd* producesse ambedue le tossine (A+B+) o nessuna delle due (A-B-)
- riconoscere l'una o l'altra delle tossine sufficiente per stabilire
 - il profilo tossinogenico dell'isolato
 - la sua rilevanza patogenetica
 - i ceppi non tossinogenici sono considerati non patogeni



HA-CDAD

Ospedale $\Rightarrow$ concentrazione infetti/malati
contaminazione ambientale

a) Aumento rischio colonizzazione

- aumenta con la lunghezza degenza
- portatori 10-30%

b) Cambiamento del rapporto

colonizzazione $\rightarrow$ infezione $\rightarrow$ malattia

- terapia/e, altri interventi
- stress



C. difficile colonizzazione $\Rightarrow$ CDAD

Colonizzazione

- probabilità incontro

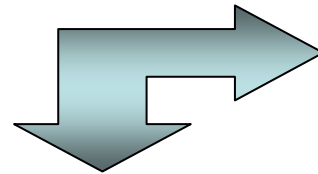


Infezione

- alterazione equilibrio flora intestinale



Malattia



Fattori microbici

- carica infettante
- patogenicità
 - tossine A & B
 - ceppi tossinogenici e non

Fattori ospite

- età
- terapia
 - antibiotici
 - gastroprotettori
- stato del soggetto
- portatore
- polimorfismo IL-8



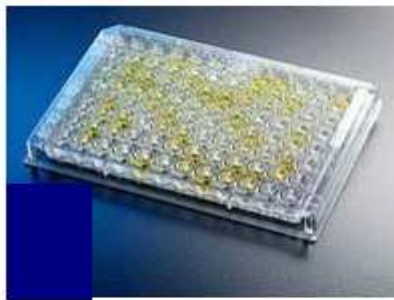
C. difficile diagnosi diretta

- Esame batterioscopico
- Isolamento ed identificazione
valutazione tossinogenicità
- Citotossicità fecale specifica su colture cellulari
gold standard
 - tossina B
- Ricerca antigeni
 - tossina A, tossina B, altri antigeni
- Metodi biomolecolari
 - tossine, 16SrRNA

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Clostridium difficile: KP–NW Study



GDH EIA



LF TOX A/B



T.CULTURE



GDH/TOX FL combo



Xpert ToxB gene



284 samples submitted for *C.difficile* toxin testing

All tested by:

- CDIFF COMPLETE LF assay (2 tests: GDH + TOX A/B)
- GDH EIA assay (96 well plate)
- CDIFF A/B toxin LF assay
- Xpert *C.difficile* PCR

If positive for GDH & toxin & PCR = Positive for *C.difficile* toxin

If all negative for all 5 tests = Negative for *C.difficile* toxin

If discrepant:



GOLD STANDARD: Toxigenic culture



- 27 specimens tested + for GDH and toxin and PCR assay → True Positives
- 224 were negative by all five tests → True Negatives
- 33 had discrepant results



Toxigenic culture

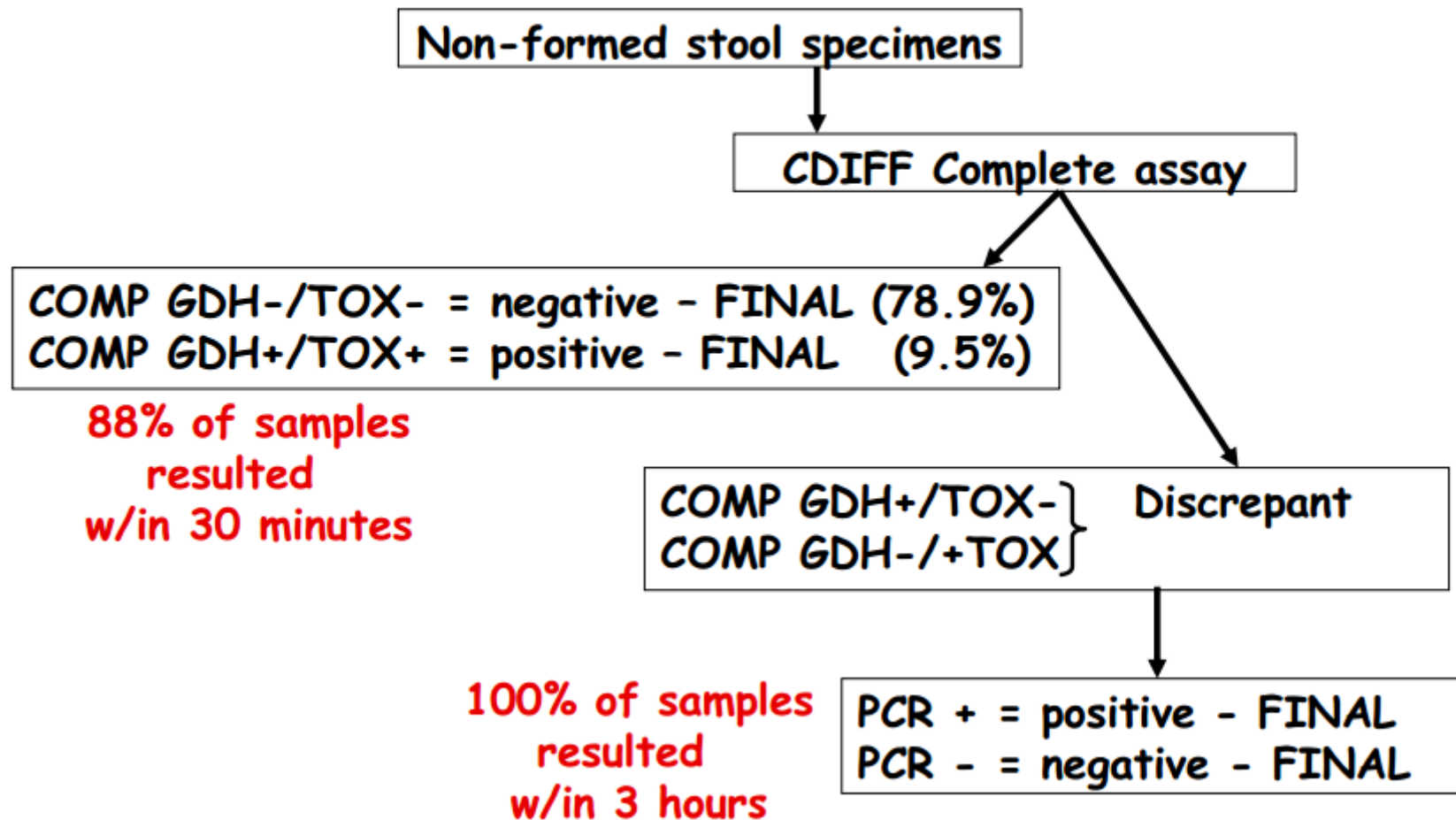


Results of initial 33 discrepant specimens.

GDH	GDH-comp	TOX	TOX-comp	PCR	# with Initial Results	# + by Toxig. Culture	# of True Pos
+	+	-	-	+	15 ^a	15	15
+	+	-	-	-	10	0	0
+	-	-	-	-	3	0	0
-	+	-	-	-	2	0	0
-	+	+	+	-	1	0	0
-	-	+	+	-	1	0	0
-	-	-	-	+	1 ^a	0	0



Clostridium difficile: Our algorithm



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive

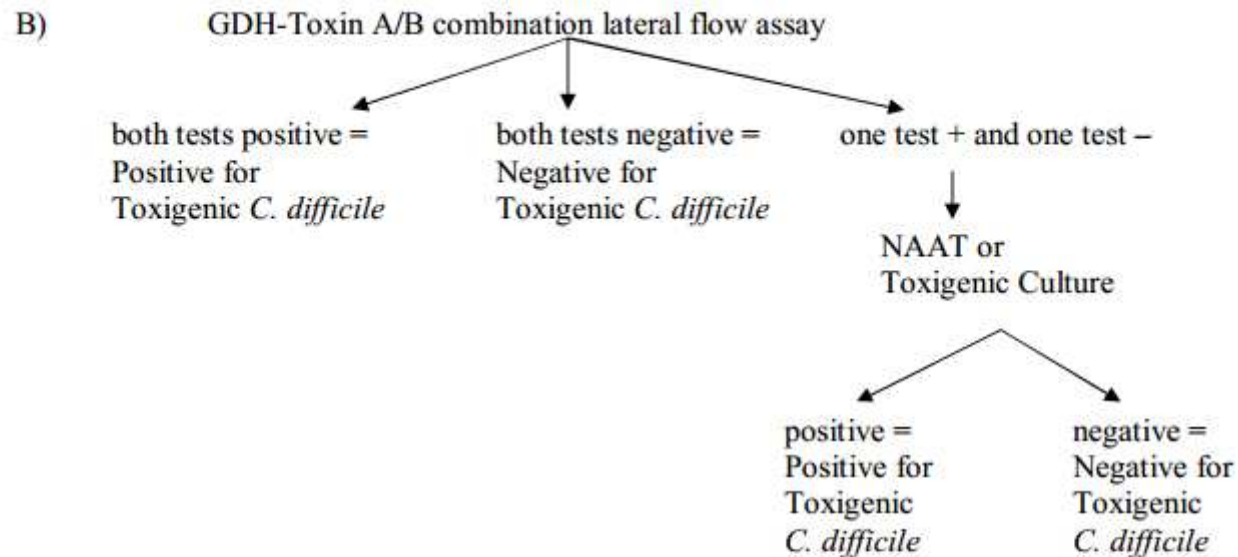


TABLE 1. Summary of test methods^a

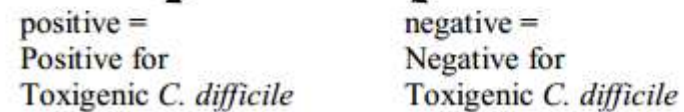
Method	Ease of use	TTD (days)	Cost	Performance characteristics (%)		Comment(s)
				Sensitivity	Specificity	
Toxigenic culture	Complex	5–7	Variable	N/A	N/A	Not standardized
EIA Tox A, B	Easy	<1	Moderate	60–81	91–99.4	Poor PPV also noted
CCCNA	Complex	2–3	Variable	67–86	97–100	Not standardized
GDH	Easy	<1	Moderate	71–100	76–98	Must also do toxin test; high NPV
NAATs	Moderate to complex	<1	Expensive	77–100	93–100	Cost-effectiveness data desirable

^a Compiled from references 4, 8, 9, 15, 17, 18, 22, 24, and 26. TTD, time to detection; EIA, enzyme immunoassay; Tox, toxin; GDH, glutamate dehydrogenase; CCCNA, cell culture neutralization assay; NAATs, nucleic acid amplification tests; N/A, not applicable; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



C) NAAT as stand alone test (To date PCR is most sensitive and specific)





C. difficile : The new epidemic

Aumento CDAD (Canada, USA) inizio 2000

- più gravi (anche mortali)
- refrattari alla terapia standard
 - più probabile la recidiva
- anziani

➤ Ceppo con caratteristiche di > virulenza

- PFGE typing (North American PFGE) → NAP1
- REA typing → BI
- Ribotyping → 027

descritto anche in Europa



C. difficile NAP1 - BI - Ribotipo 027

- Tossine A e B ad alto titolo
- Delezione *tcdC*
 - *tcdC* troncata
 - perdita funzione regolatoria negativa
 - aumento produzione tossine → maggiore patogenicità
- Tossinotipo III
 - 80% dei non B1/NAP1 sono tossinotipo 0
 - PMC >frequentemente associata al tossinotipo III
- Tossina binaria
 - 6% ca negli isolati storici, associata a diversi tossinotipi
- Resistenza *in vitro* ai fluorochinoloni



- Il lavoro di S. Bacci ha comparato i tassi di mortalità in pazienti positivi per infezione da ceppi di C.difficile per le tossine A e B (senza la presenza di tossina binaria n=212) con i pazienti infettati con ceppi di C. difficile possessori di tossina A e B e tossina binaria (n= 265).
- Il gruppo di pazienti con la tossina binaria è caratterizzato dalla presenza sia del Ribotipo ipervirulento 027 (CD027 = 193) sia non 027 (CD non-027 = 72).
- I pazienti infettati con ceppi produttori di tossina binaria hanno un maggiore tasso di mortalità di quelli non possessori di tossina binaria il rischio relativo attraverso analisi statistica è risultato pari a 1.8 con un C.I. 1.2-2.7. L'analisi statistica dopo correzione per età, sesso e regione geografica è risultata essere: RR 1.6, 95% CI 1.0–2.4.



Studio focalizzato su 4 gruppi di pazienti

	Tossina A e B	Tossina Binaria
C.difficile PCR Ribotipo non 027 (CD non 027)	+	+
C.difficile PCR Ribotipo 027 (CD 027)	+	+
C.difficile Tossina A e B positiva (tossina binaria negativa)	+	-
C.difficile CD – non tossigenico	/	/

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive

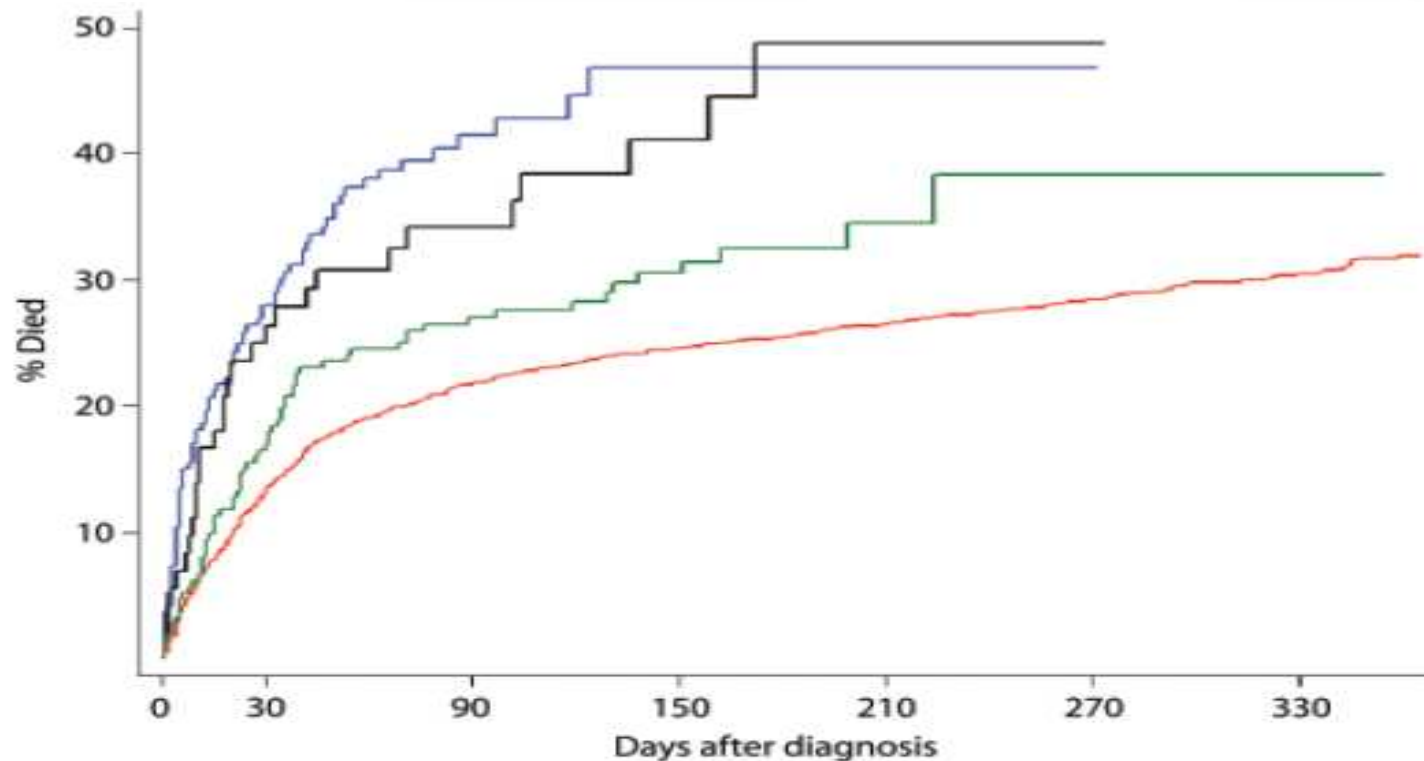


Figure 2. Kaplan Meier curves showing the probability of patient survival after diagnosis of *Clostridium difficile* infection according to the 4 different infection groups (log-rank test, $p < 0.001$). Blue line, *C. difficile* PCR ribotype 027; black line, *C. difficile* PCR ribotype non-027; green line, *C. difficile* with toxins A and B without binary toxin; red line, *C. difficile* unselected strains not referred for typing.



- **Simili casi di mortalità (27.8%, 28.0%) sono stati osservati in pazienti infettati rispettivamente con CD 027 o CD non-027.**
- **La tossina binaria, sembra essere un marker che incrementa la virulenza dei ceppi di C.difficile.**
- **Gli sforzi nel controllare l'infezione da C.difficile potrebbero essere indirizzati verso l'analisi dei ceppi virulenti in quanto portatori di tossina binaria, indipendentemente dal ribotipo PCR.**



Timing of assays

Recommendations

Repeat testing should be discouraged. (Strong recommendation, moderate-quality evidence)

Testing for cure should not be done. (Strong recommendation, moderate-quality evidence)

Summary of the evidence.

Several studies have shown that **repeat testing after a negative test is positive in < 5%** of Specimens and repeat testing increases the likelihood of false positives. If repeat testing is requested, the physician should confer with the laboratory to explain the clinical rationale. There is no evidence that repeated testing can enhance the sensitivity or negative predictive values of NAATs for *C. difficile* diagnosis compared with TCs. Empiric therapy for CDI should not be discontinued or withheld in patients with a high pre-test suspicion for CDI. Studies have shown that both toxin A + B EIA and TC may remain positive for a long as 30 days in patients who have resolution of symptoms. False positive “test of cure” specimens may complicate clinical care and result in additional courses of inappropriate anti- *C. difficile* therapy.



Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA)

TABLE 3. Recommendations for the Treatment of *Clostridium difficile* Infection (CDI)

Clinical definition	Supportive clinical data	Recommended treatment	Strength of recommendation
Initial episode, mild or moderate	Leukocytosis with a white blood cell count of 15,000 cells/ μ L or lower and a serum creatinine level less than 1.5 times the premorbid level	Metronidazole, 500 mg 3 times per day by mouth for 10–14 days	A-I
Initial episode, severe*	Leukocytosis with a white blood cell count of 15,000 cells/ μ L or higher or a serum creatinine level greater than or equal to 1.5 times the premorbid level	Vancomycin, 125 mg 4 times per day by mouth for 10–14 days	B-I
Initial episode, severe, complicated	Hypotension or shock, ileus, megacolon	Vancomycin, 500 mg 4 times per day by mouth or by nasogastric tube, plus metronidazole, 500 mg every 8 hours intravenously. If complete ileus, consider adding rectal instillation of vancomycin	C-III
First recurrence	...	Same as for initial episode	A-II
Second recurrence	...	Vancomycin in a tapered and/or pulsed regimen	B-III

* The criteria proposed for defining severe or complicated CDI are based on expert opinion. These may need to be reviewed in the future upon publication of prospectively validated severity scores for patients with CDI.

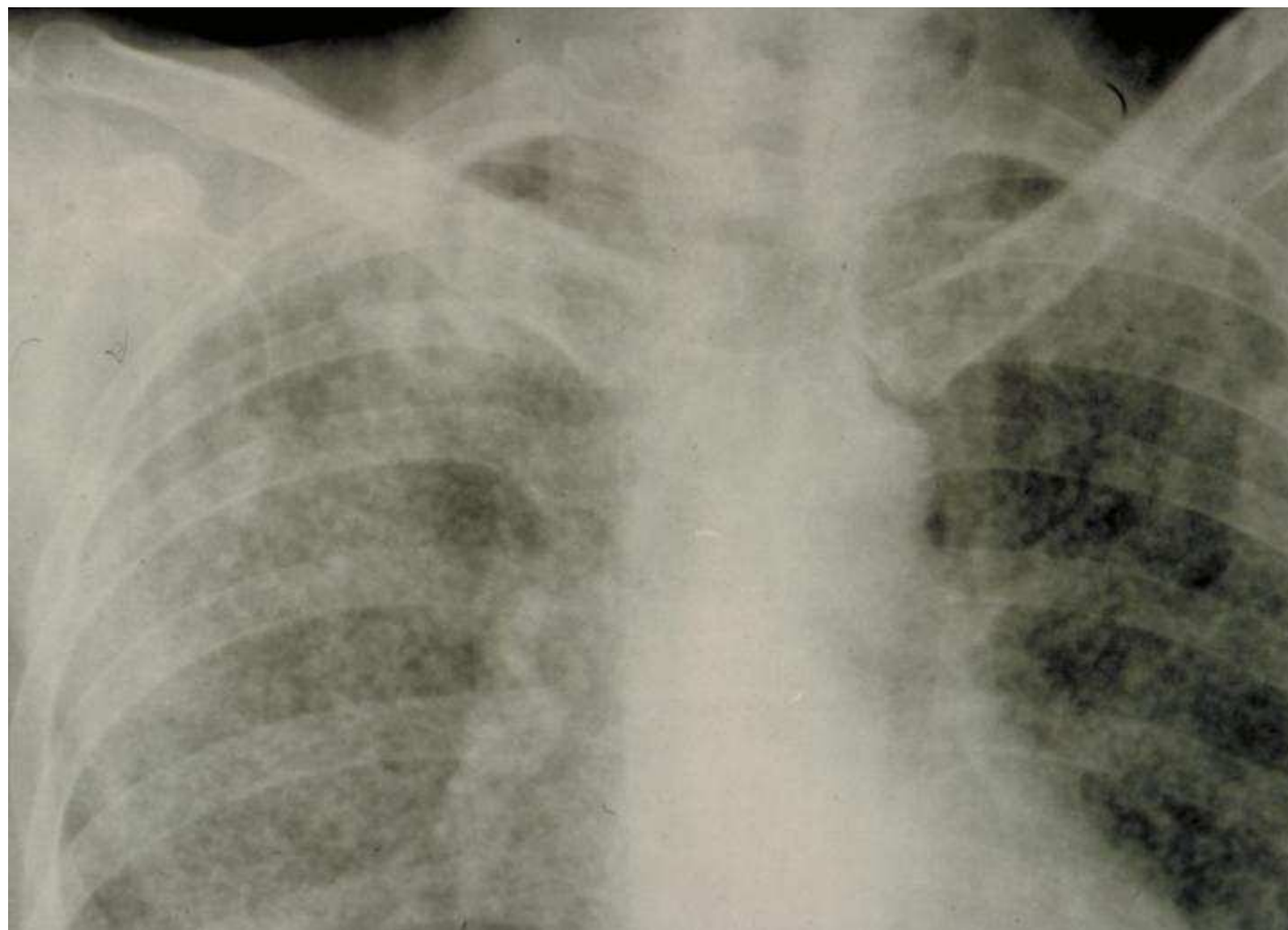
3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



...The need for speed in medicina

- Diarrea nell'anziano
- TBC nell'anziano

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive





Microbiologia

Mycobacterium tuberculosis

- Gli agenti eziologici della tubercolosi sono raggruppati nel **Mycobacterium tuberculosis complex**, all'interno del quale il più importante è **M. tuberculosis hominis** (MTB). Altri: **M. bovis**, **M. africanum**.
- Patogeno intracellulare, a trasmissione interumana
- La ricchezza in lipidi della loro parete cellulare conferisce ai micobatteri alcune particolari caratteristiche:
 - lento tempo di moltiplicazione
 - acido-alcool resistenza
 - reazione del sistema immunitario come da "corpo estraneo"
 - inefficacia della maggior parte dei comuni antibiotici



Epidemiologia

Le ragioni di una attenzione globale

- Prevalenza dell'infezione: 2 miliardi
- Nuovi casi per anno: 8 milioni
- Morti per anno: 2 milioni (esclusi HIV)
- Morti evitabili: ~ 30%

A distanza di oltre 120 anni dalla scoperta del bacillo tubercolare e nonostante l'efficacia dei farmaci, la TB è la prima causa di morte da singolo agente infettivo.



Occurrence

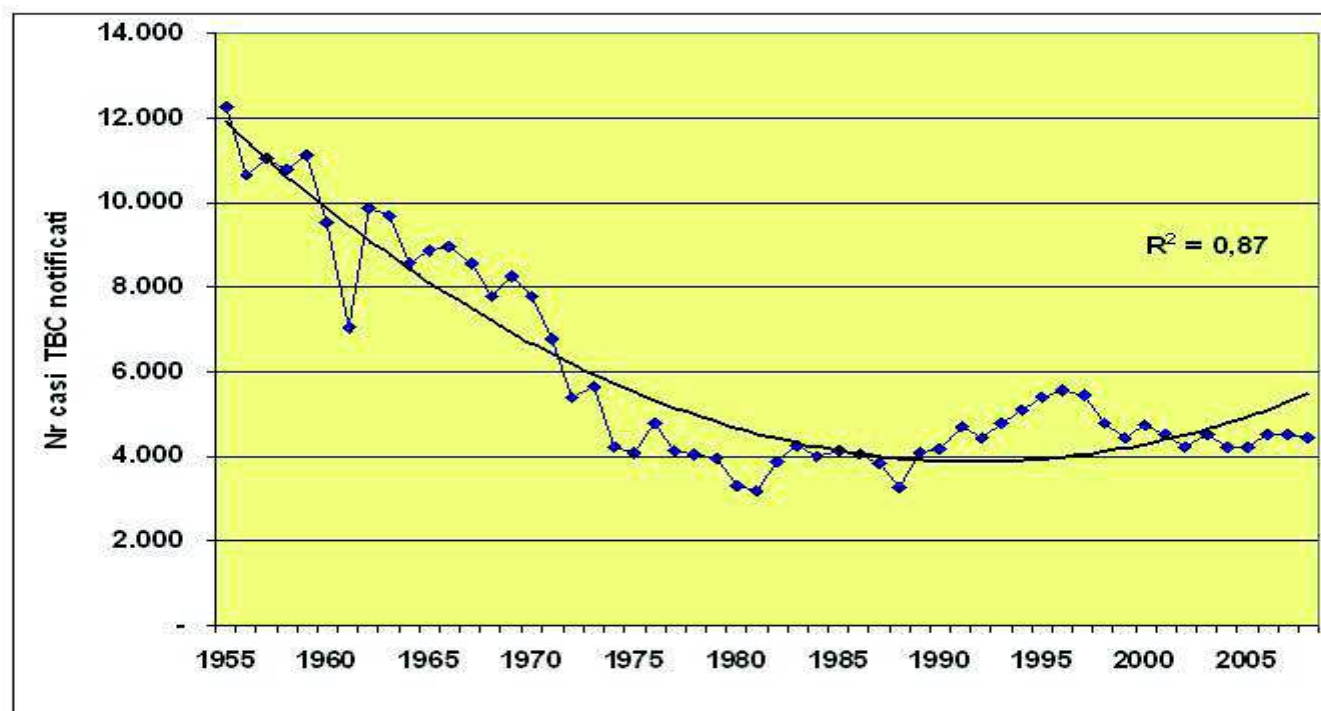
- Nearly one-third of the world's population is infected with TB, which kills almost 3 million people per year.



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive

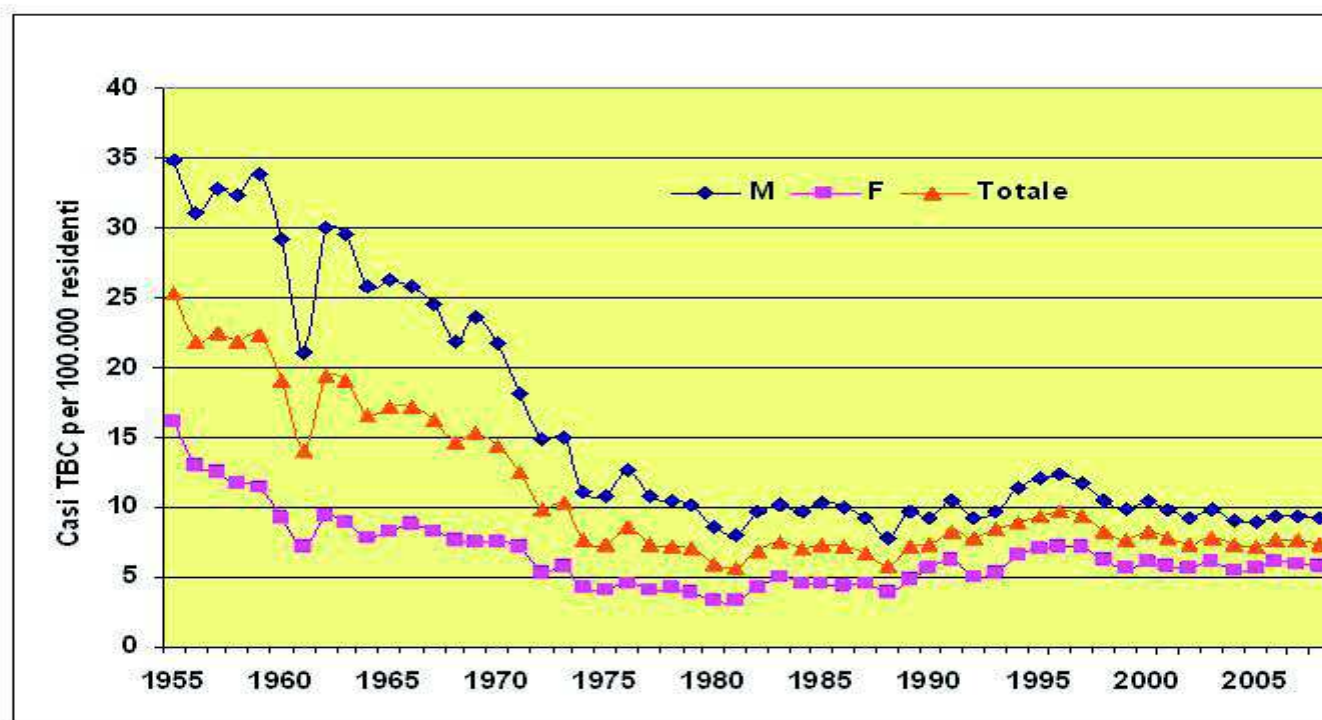


Nr casi TBC notificati in Italia dal 1955 al 2008



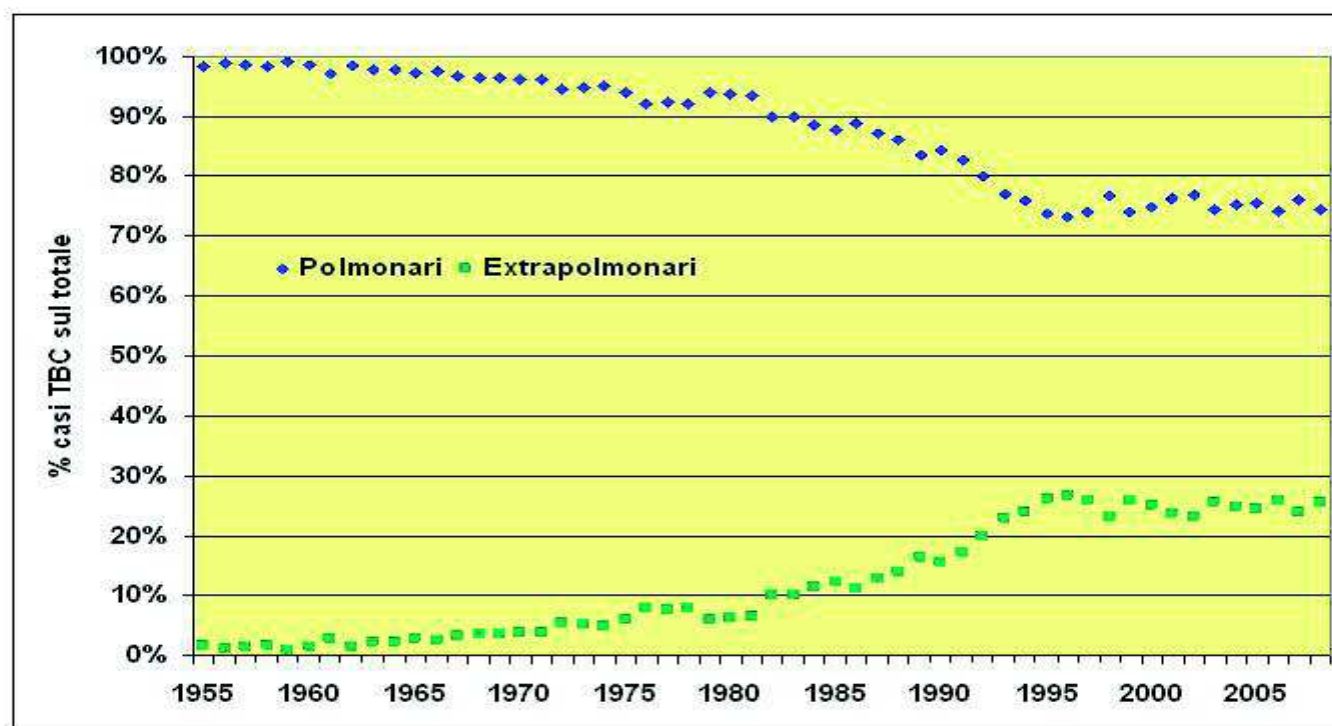


Nr casi TBC notificati in Italia per sesso dal 1955 al 2008





Percentuale casi TBC per sede anatomica polmonare o extrapolmonare dal 1955 al 2008



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



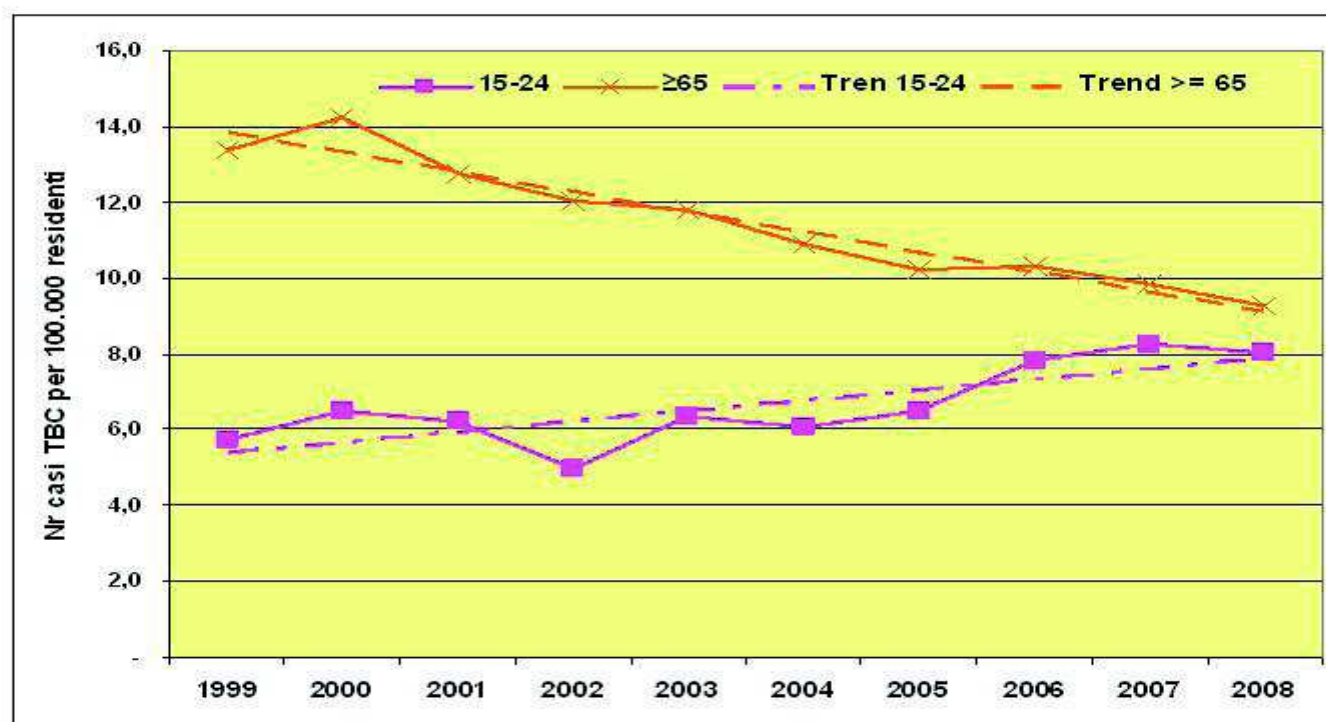
Tasso di incidenza di TBC per classi di età dal 1999 al 2008 (per 100.000 residenti)



3° CONGRESSO NEWMICRO
 ...The need for speed: il
 laboratorio di Microbiologia e le
 Urgenze Infettive



Confronto linee di tendenza dei tassi standardizzati in ultrasessantacinquenni e adolescenti/giovani adulti





Casistica BK Mestre

	2008	2009	2010	2011	2012
Tot. Positivi per BK	24	37	40	29	26
Positivi ITALIANI	9	20	14	11	7
Rifampicina Resistenza	0	0	0	0	0
Età media (aa)	64	63.5	55.6	69.2	63
Min-max (aa)	39-83	2 (20)-92	22-92	53-92	25-91



Manifestazioni cliniche

Tubercolosi polmonare

Sintomatologia

– Fasi precoci

- febbre (spesso di basso grado e intermittente)
- sudorazione notturna
- perdita di peso e anoressia
- malessere generale e astenia

– Fasi successive

- tosse (inizialmente non produttiva, poi con essudato purulento)
- emottisi
- dolore toracico (se ci sono lesioni subpleuriche)
- dispnea (in caso di malattia estesa)

Esame obiettivo

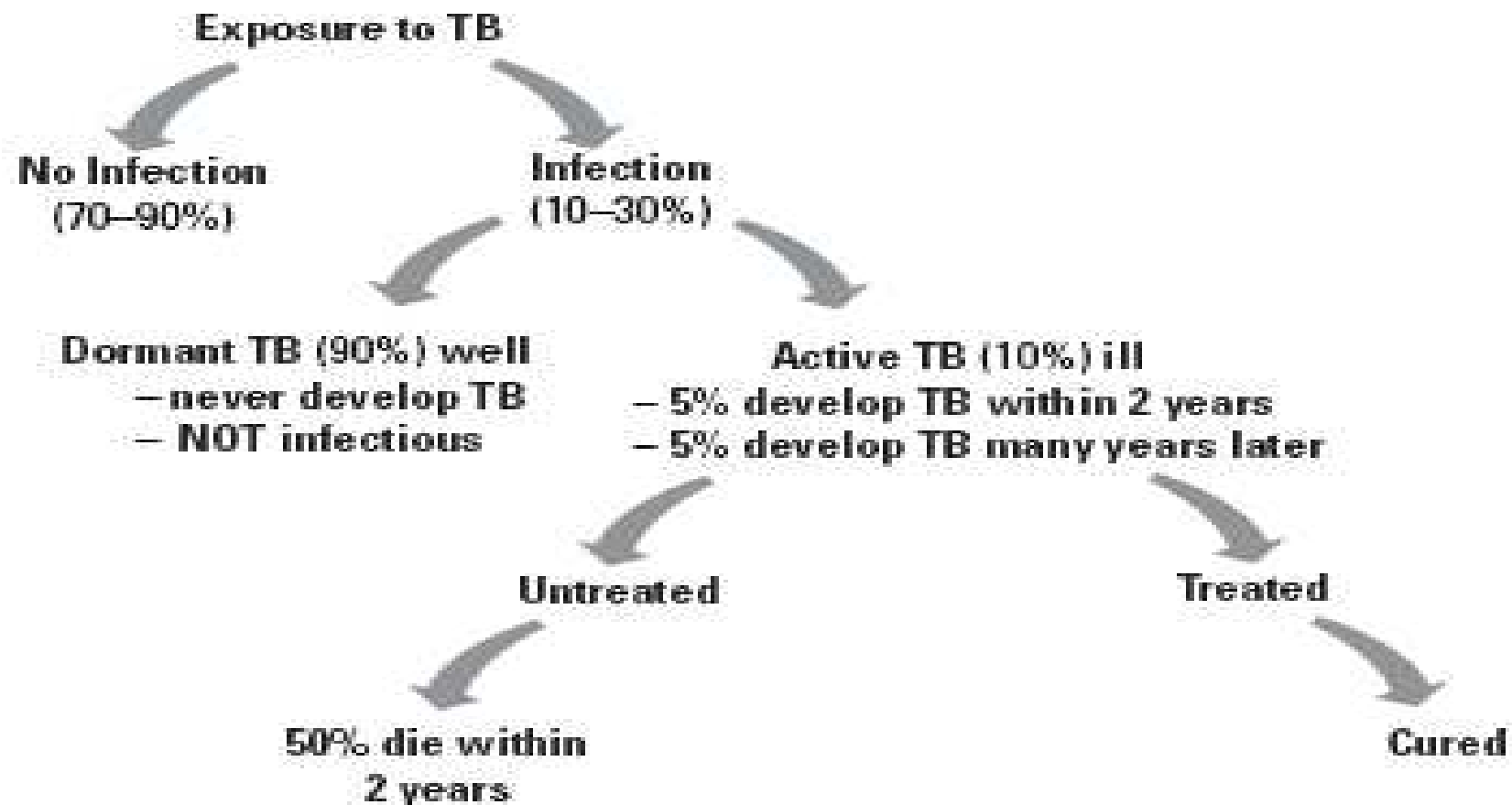
- di limitata utilità (spesso negativo, a volte rantoli o ronchi)

Esami di laboratorio

- lieve anemia e leucocitosi
- a volte iponatriemia (per siadh)

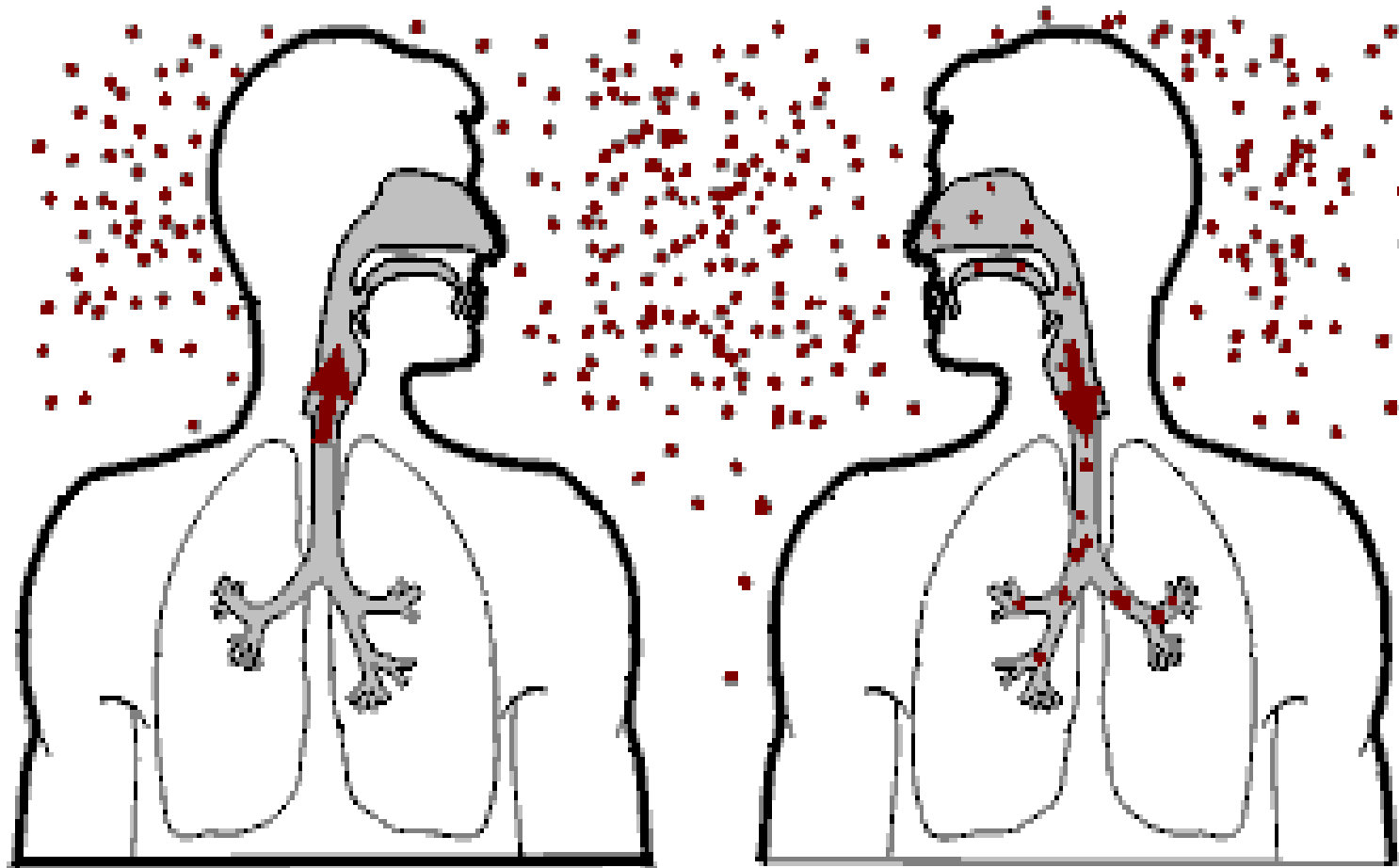


Storia naturale della infezione tuberculare



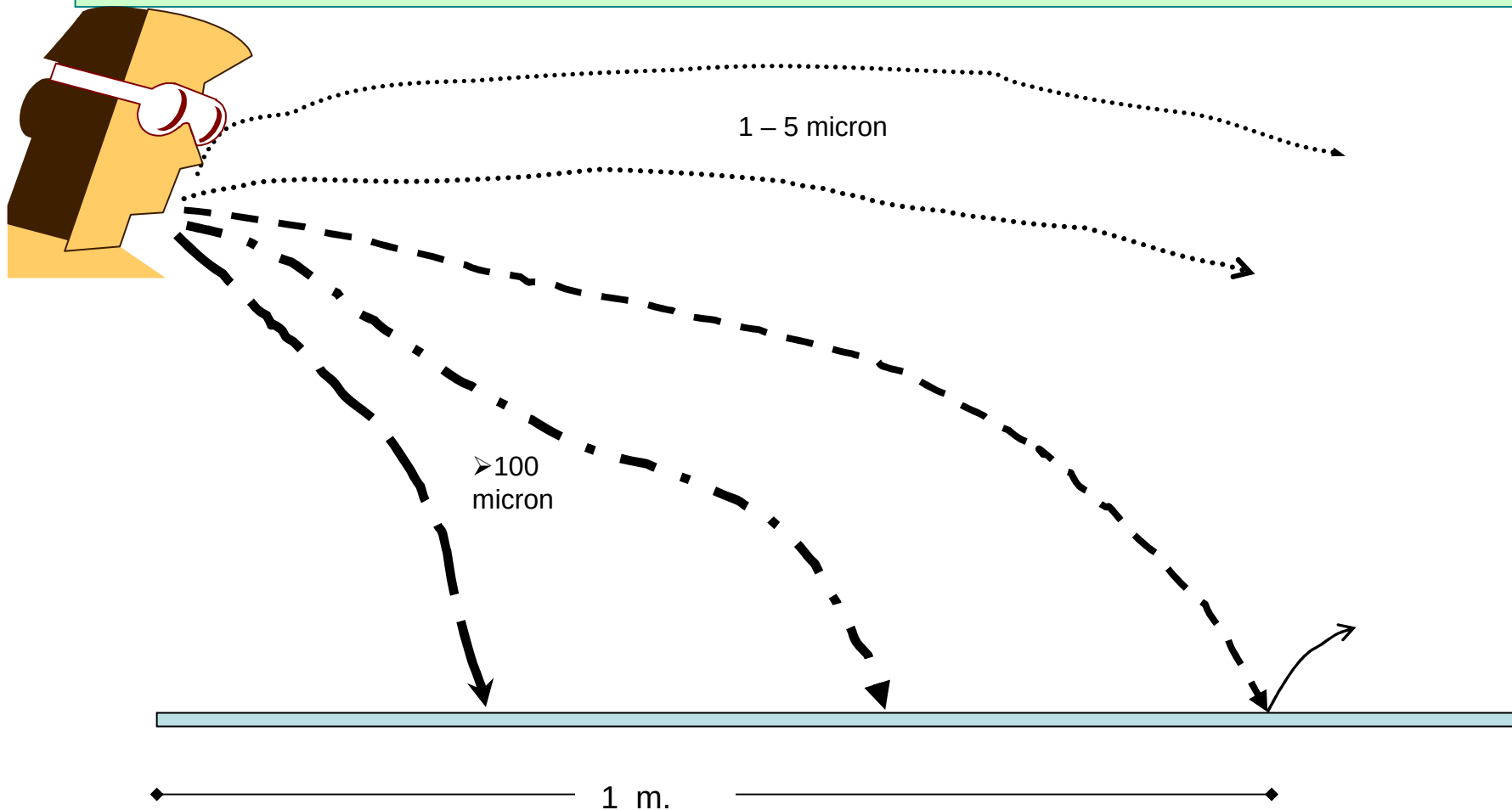


Trasmissione dell'infezione tubercolare





Destino delle goccioline respiratorie





Il droplet nucleo

- Un droplet nucleo può trasportare 3 – 10 micobatteri.
- Un colpo di tosse può produrre 3.000 droplet nuclei (circa 10.000 micobatteri).
- Parlare per 5 minuti produce tanti droplet nuclei quanti un colpo di tosse.
- Uno starnuto ne produce di più...



Contagio tubercolare

- La fonte è costituita da pazienti affetti da TBC attiva dell'Apparato Respiratorio (polmoni, bronchi, laringe).
- La contagiosità può variare notevolmente a seconda del tipo e della sede della lesione.
- La contagiosità diminuisce rapidamente dopo l'inizio di una terapia specifica efficace.



È pericoloso il contagio ?

- ❖ Ogni paziente contagioso infetta il 40-50 % dei contatti stretti
- ❖ Nei contagiati il 5-10 % si ammala di TB
 - 3-5 % malati nei primi 2 anni
 - 2-5 % cumulativo per il resto della vita
- ❖ Nei malati:
 - Probabilità di guarigione = 80 %
 - Probabilità di morte = 1 %



Fattori di rischio per il contagio

- ✓ Carica batterica
- ✓ Contagiosità del paziente:
 - ✦ Positività dell'esame diretto dell'espettorato
 - ✦ Presenza di caverne
- ✓ Frequenza/durata di esposizione
- ✓ Luogo del contatto:
 - ✦ Spazi piccoli e mal ventilati
- ✓ Condizioni di recettività (suscettibilità ospite)
- ✓ Ritardo di diagnosi e di inizio della terapia



Tipi di contatto

- **Contatto stretto**: persona che convive con il caso indice o che ha condiviso lo stesso spazio confinato per numerose ore al giorno.
- **Contatto regolare**: persona che condivide regolarmente lo stesso spazio chiuso.
- **Contatto occasionale**: persona che condivide occasionalmente lo stesso luogo chiuso.



Esempi di contatto in alcune realtà

<i>Contatto</i>	<i>Scuola</i>	<i>Luogo di lavoro</i>	<i>Ospedale</i>
<i>Stretto</i>	Studenti e professori della stessa classe	Dividono lo stesso ufficio	Compagni di camera
<i>Regolare</i>	Frequentano regolarmente la stessa palestra o gli stessi mezzi di trasporto	Dividono regolarmente i pasti con il caso indice	Infermieri e medici
<i>Occasionale</i>	Altri (es. studenti della stessa sezione)	Altri (es. uffici dello stesso piano)	Pazienti in sala d'attesa comune



Gruppi ad alto rischio (oltre agli HIV positivi) per condizioni patologiche favorenti

- Grave deperimento organico.
- Prolungata terapia immunosoppressiva.
- M. di Hodgkin e altre malattie linfoproliferative.
- Esiti radiografici di TBC mai trattati.
- Diabete scarsamente controllato.
- Silicosi.
- Gastrectomia.



Veri gruppi a rischio nella nostra realtà

- **Contatti** cutinegativi di casi indice di TBC escreato positiva.
- **Personale di strutture sanitarie e/o assistenziali** a rischio di contatto con malati TBC escreato positivi.
- Soggetti cutinegativi che vivono in comunità ad alta incidenza di TBC, con condizioni di vita che favoriscono l'infezione e/o la riattivazione della malattia (extracomunitari, residenti in strutture lungodegenziali per anziani...)



Diagnosi

Diagnosi di malattia attiva

Microscopia diretta

– diagnosi presuntiva

- bacilli acido-resistenti (BAAR) all'esame tradizionale
- Ziehl Neelsen / Auramina-Rodamina
- la presenza di micobatteri all'esame diretto dell'espettorato, del lavaggio gastrico o del BAL è il segno della massima **infettività**

Esame colturale

– diagnosi definitiva

- necessarie **4/8 settimane** prima di poter rilevare la crescita
- l'uso di terreni liquidi con rilevatore radiometrico di crescita può ridurre a 2/3 settimane il tempo necessario

Campioni diagnostici: espettorato, frammenti di tessuto...

Sebbene le linee guida raccomandino l'analisi di tre campioni raccolti in giorni diversi, recenti studi negano che il secondo e il terzo esame aumentino la sensibilità diagnostica.

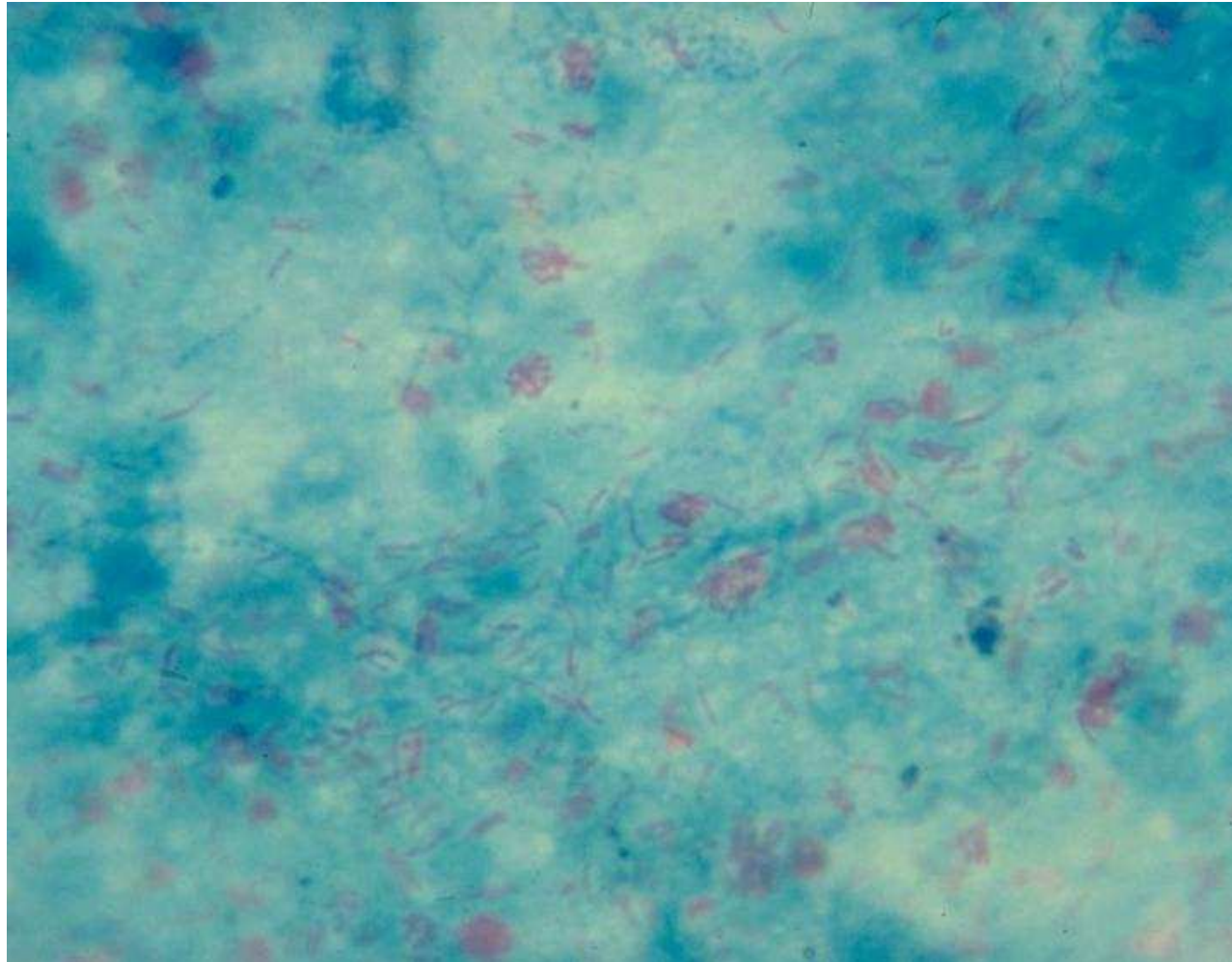
Echbaum Q. et al. *Am J Clin Pathol* 2002
Leonard M.K. et al. *Am J Infect Control* 2005

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Campione di espettorato positivo

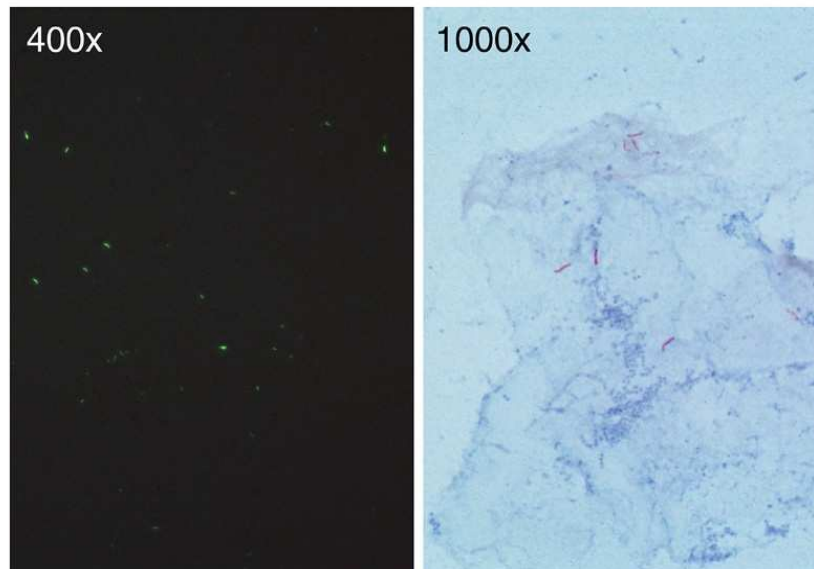
Colorazione di Ziehl-Nielsen





MICROSCOPIA

- Rapido
- Poco costoso
- **Specificità > 95%**
- Ottimo test per il controllo della TB in Paesi ad alta incidenza
- Non permette identificazione di specie
- **Sensibilità 25-65% (90% dei casi contagiosi)**
- La sensibilità aumenta con il numero di campioni esaminati



1 st AFB smear	80-82 %
2 nd AFB smear	10-14 %
3 rd AFB smear	5-8 %

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Esame colturale positivo per *Mycobacterium tuberculosis*

Terreno di Lowenstein-Jensen





COLTURA: IL “GOLD-STANDARD”: dal LJ e Bactec 460 ai sistemi automatici con software dedicati



- E' il test di riferimento.
- L'esame microscopico richiede 5000-10000 BAAR per avere vetrino positivo
- L'esame colturale richiede 10-50 micobatteri vivi
- Aumento dei casi TB rilevati: 30-50%
- Diagnosi definitiva di TB
- Punto di partenza per i saggi di sensibilità ai farmaci
- Tempi lunghi di risposta (6-8 settimane se negativo)
- Alto livello di bio-sicurezza: per colture da campione BSL2, per antibiogrammi BSL3 (2+)



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



XPERT TB-MDR

MTB / Rif-resistance test

Workflow

- sputum
- simple 1-step external sample prep. procedure
- time-to-result < 2 h
- throughput: >16 tests / day / module
- no need for biosafety cabinet
- integrated controls
- true random access

Performance

- specific for MTB
- sensitivity better than smear, similar to culture
- detection of rif-resistance via rpoB gene

Product and system design

- test cartridges for GeneXpert System
- several GeneXpert modules can be combined in 1 workstation
- swap replacement of detection unit
- ~1 day technician training for





Diagnosi

Diagnosi di malattia attiva

Amplificazione degli acidi nucleici

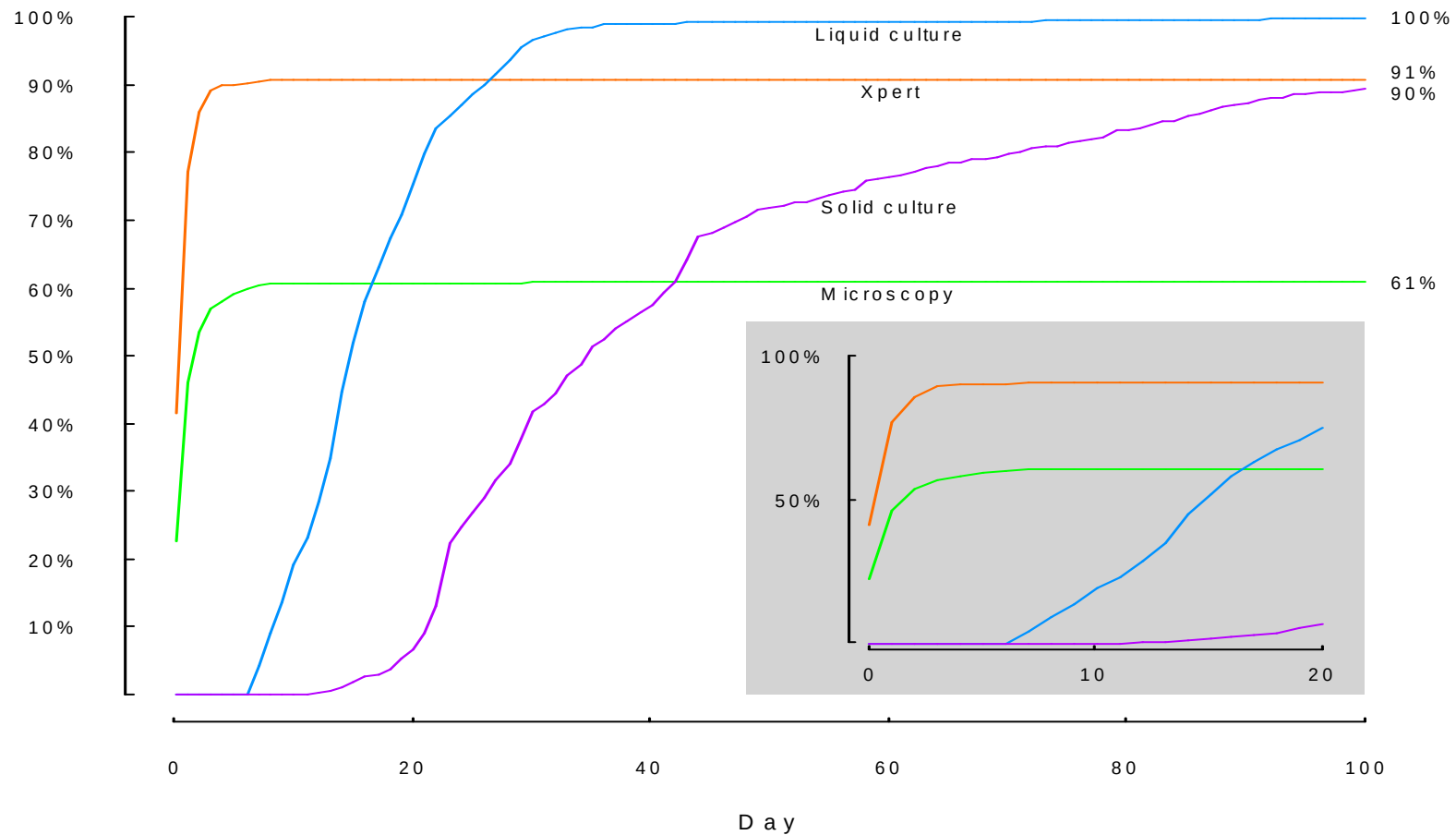
- può permettere la diagnosi in **poche ore**
- bassa sensibilità (maggiore dell'esame diretto, minore del colturale)
- alti costi
- oggi possono trovare utilità in:
 - soggetti con BAAR all'esame diretto, per la conferma di malattia
 - soggetti negativi all'esame diretto, in casi selezionati

Test di sensibilità ai farmaci

- inizialmente isoniazide, rifampicina ed etambutolo
- se vengono rilevate resistenze o se il paziente non risponde alla terapia è necessario testare anche altri antibiotici
- tempi richiesti: **3/8 settimane**
- iniziano ad essere disponibili test molecolari per l'identificazione rapida delle resistenze (es. PCR per mutazioni su *rpoB*)

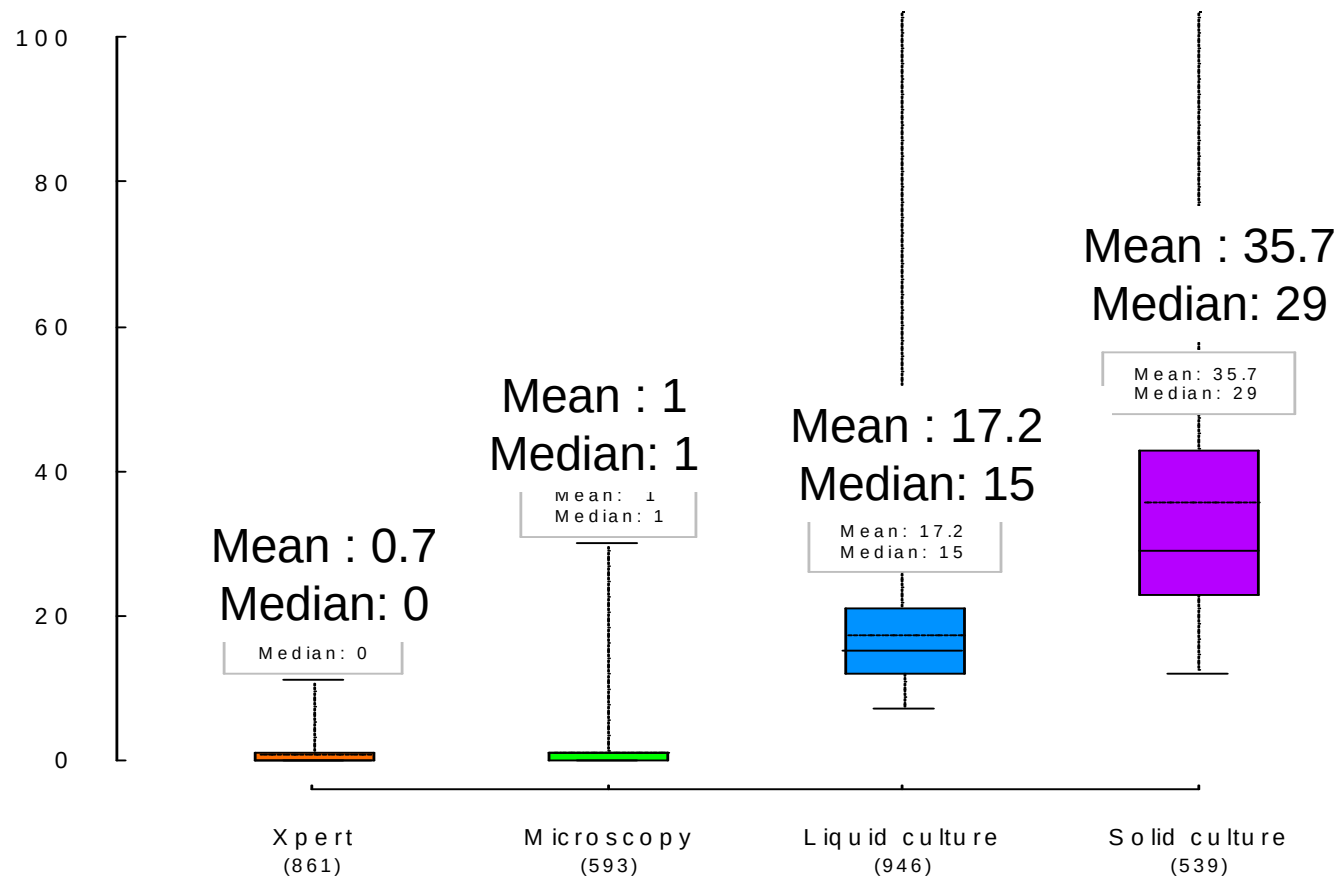


Proportion of TB cases detected





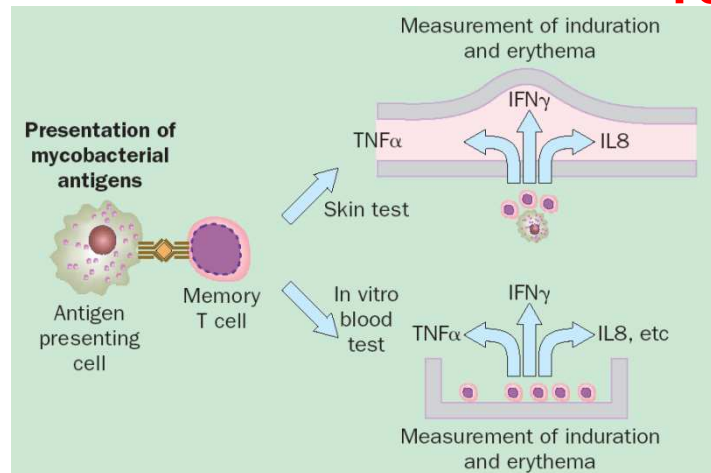
Time to detection of TB





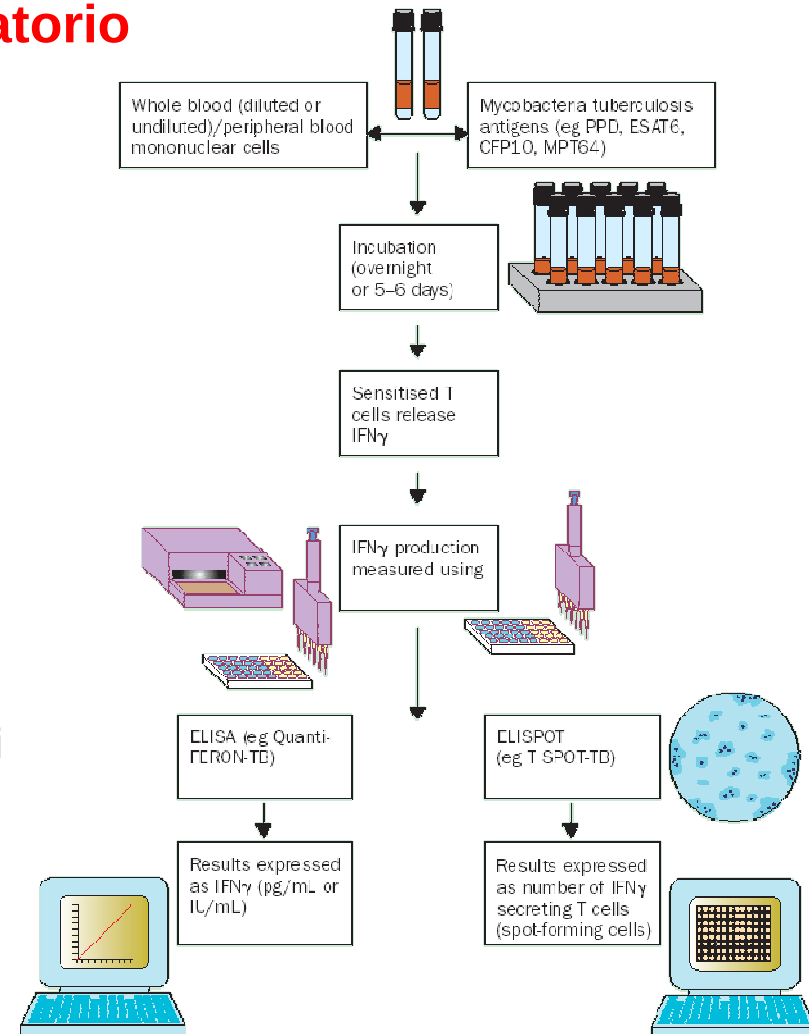
TB - Diagnosi di infezione latente

Test di laboratorio



Test basati su IFN-γ

- test **in vitro** che misurano l'**IFN-γ** rilasciato dai linfociti T in risposta ad antigeni tubercolari
- per la stimolazione vengono utilizzati gli antigeni **ESAT-6** e **CFP-10**, **specifici per MTB ed assenti nel BCG**
 - **QuantiFERON-TB Gold®**: misura la quantità di IFN-γ prodotto, attraverso tecnica Elisa
 - **T-SPOT.TB®**: misura il numero di linfociti T che producono IFN-γ, attraverso tecnica Elispot





Diagnosi

Diagnosi di malattia attiva

Esami radiologici

- il sospetto iniziale di TB è spesso basato su anomalie radiografiche in soggetti con sintomi respiratori
- quadro classico:
 - coinvolgimento dei lobi superiori
 - infiltrati e caverne

In realtà la TB può presentarsi persino con radiogrammi negativi





Strategie per il controllo

Misure per il controllo della TB

- **Principali misure per il controllo della TB:**
 - trattamento farmacologico e gestione dei pazienti con TB
 - identificazione, sorveglianza e trattamento dei gruppi ad alto rischio
 - contatti di casi di TB
 - persone con infezione da HIV
 - altri gruppi a rischio
 - vaccinazione con BCG
- I ritardi diagnostici contribuiscono ad aumentare i casi di malattia in fase avanzata, con maggiore potenziale di contagio



Trattamento della malattia

Terapia

- TB non trattata:
 - morte entro poche settimane o mesi
 - remissione spontanea
 - malattia a decorso cronico, progressivamente debilitante
- La chemioterapia divenne possibile con la scoperta della streptomicina
- Dopo meno di 2 settimane di trattamento efficace e ben condotto, la contagiosità si annulla
- Punti cardine della terapia antitubercolare:
 - **almeno due farmaci** (per evitare resistenze)
 - **lunghi periodi di trattamento** (per evitare ricadute)



ANTITUBERCOLOSIS DRUGS CURRENTLY IN USE IN THE UNITED STATES

First-line Drugs

Isoniazid
Rifampin
Rifapentine
Rifabutin*
Ethambutol
Pyrazinamide

Second-line Drugs

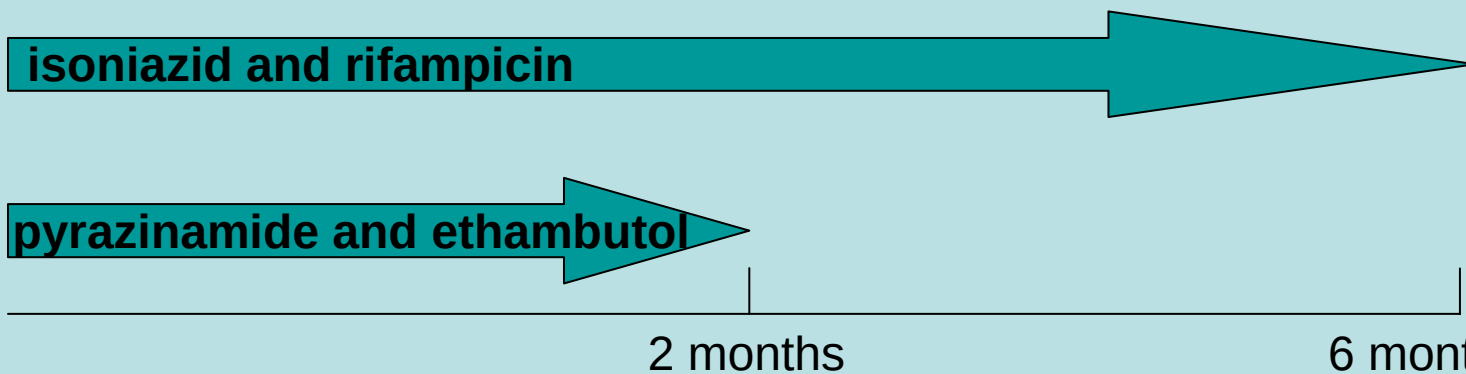
Cycloserine
Ethionamide
Levofloxacin*
Moxifloxacin *
Gatifloxacin *
***p*-Aminosalicylic acid**
Streptomycin
Amikacin/kanamycin
Capreomycin

* Not approved by United States Food and Drug administration for use in the treatment of tuberculosis



Principi generali

Per la TB polmonare attiva il trattamento standard prevede 4 farmaci per 2 mesi e 2 farmaci per 4 mesi





Trattamento della malattia

Tubercolosi multiresistente

- Il termine di multiresistenza (MDR) identifica quei bacilli che **NON** sono sensibili (almeno) all'isoniazide ed alla rifampicina
- La multiresistenza influenza in maniera significativa la gestione e la prognosi
- Il riscontro di una multiresistenza primaria nel soggetto immunocompetente è evento del tutto infrequente (1%)
- La stragrande maggioranza dei casi di TB-MDR sono osservati in soggetti già sottoposti a uno o più trattamenti: **MDR secondaria**
 - incongruità terapeutica
 - mancata compliance del paziente
- **Scarso successo terapeutico** (in Italia il 40% raggiunge guarigione clinica)
- Utilizzo di farmaci di seconda linea per lunghi periodi (maggiori effetti collaterali)
- La gestione dovrebbe essere affidata a centri specializzati



Drug-Resistant TB: Definitions

- **Mono-resistant:** resistance to a single drug
- **Poly-resistant:** resistance to more than one drug, but not to the combination of isoniazid and rifampicin
- **Multidrug-resistant (MDR):** resistance to at least isoniazid and rifampicin
- **Extensively drug-resistant (XDR):** MDR plus resistance to fluoroquinolones and at least 1 of the 3 injectable drugs (amikacin, kanamycin, capreomycin)



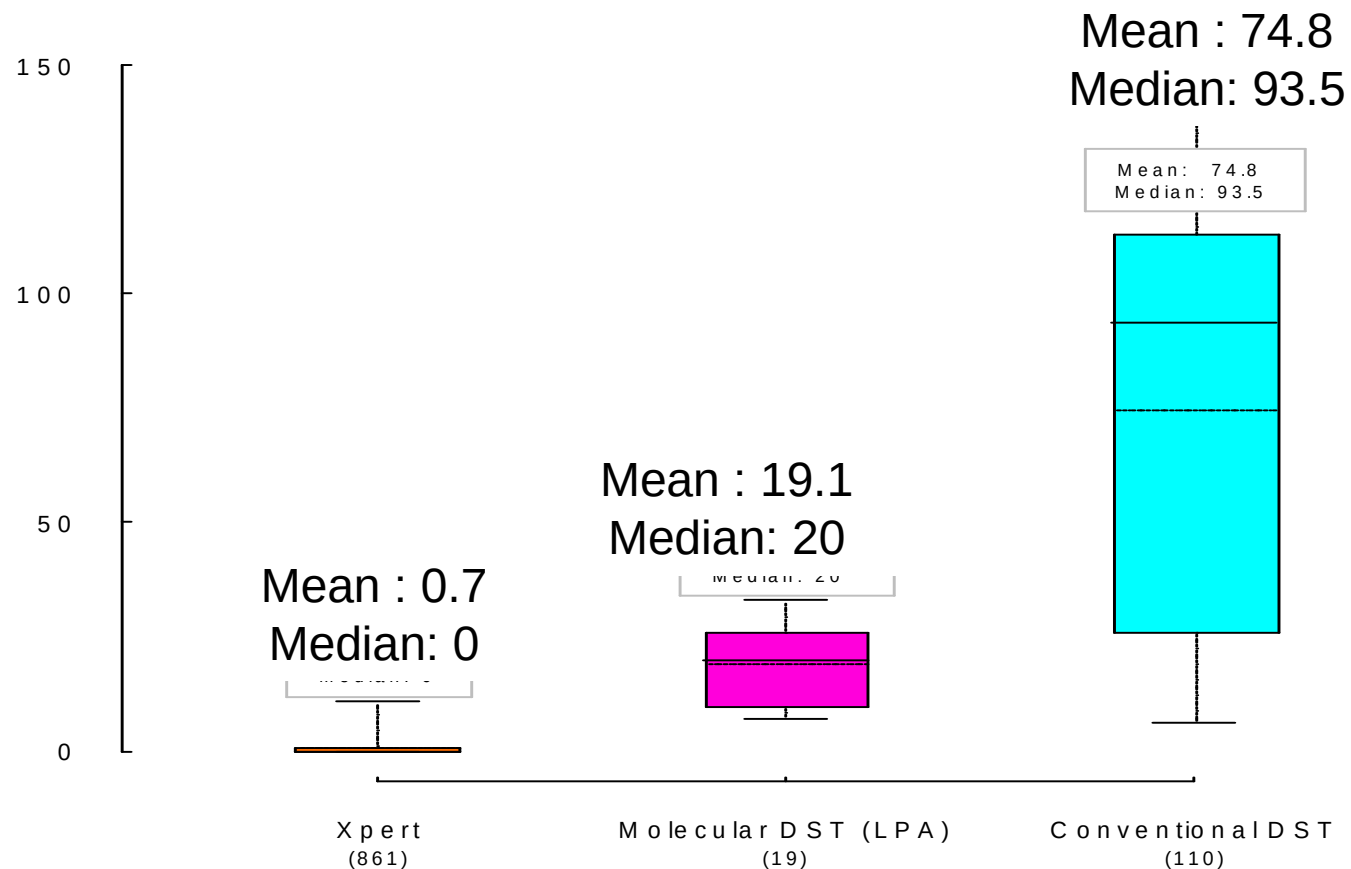
RIF res come “surrogate marker” per MDR TB

- RIF resistenza non è frequente come monoresistenza (5-15%)
- 80-95% of RIF resistenti sono resistenti anche a INH

- Farmaco chiave nel regime anti TB
- Bassa frequenza di mutazioni spontanee
- Mutazioni concentrate in una regione hot-spot in *rpoB* gene



Time to rifampicin detection





Key messages

- La TB è ancora oggi una delle principali **cause di morte** nel mondo
- La **diagnosi eziologica di TB** si basa sull'identificazione dell'agente patogeno in campioni biologici (generalmente espettorato). Peraltro un terzo dei casi rimangono microbiologicamente negativi
- La **terapia della malattia attiva** prevede schemi terapeutici standardizzati a più farmaci, per aumentare le probabilità di successo e limitare l'insorgenza di forme resistenti
- L'**infezione tubercolare latente** fin'ora poteva essere dimostrata solo con il test cutaneo alla tubercolina, scarsamente sensibile e specifico. Test in vitro di recente introduzione possono superare i limiti del test cutaneo
- Per contenere la diffusione della tubercolosi è fondamentale identificare i soggetti candidati al **trattamento dell'infezione latente**, soprattutto tra coloro che hanno rischio maggiore di sviluppare la malattia attiva

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



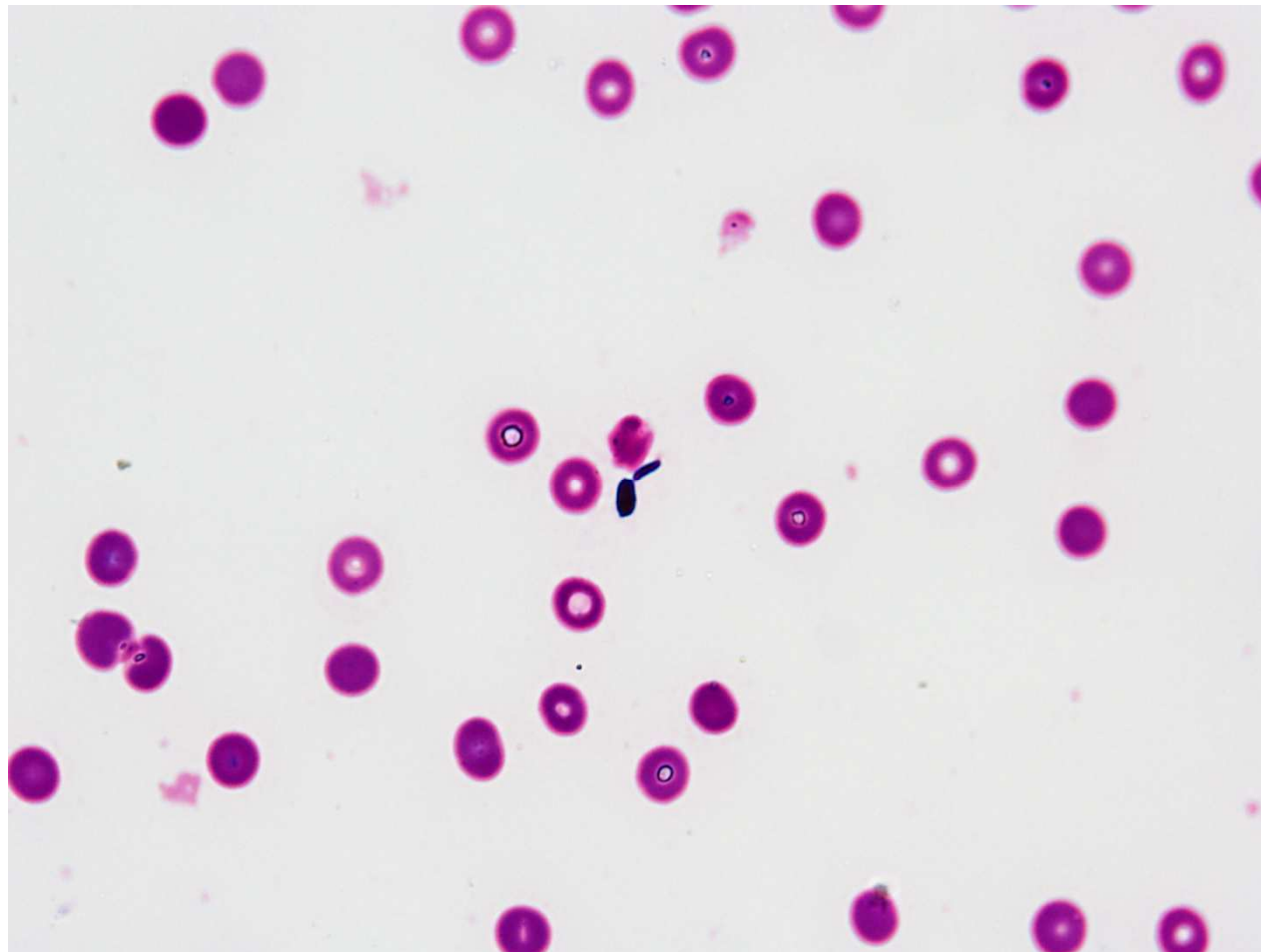
...The need for speed in medicina

- Diarrea nell'anziano
- TBC nell'anziano
- **Esame microscopico con col. di Gram**

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Candidemia





Candidemia: mortalità

	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Others	All
	Mortality (%) Death/N of episodes	Mortality (%) Death/N of episodes	Mortality (%) Death/N of episodes	Mortality (%) Death/N of episodes	Mortality (%) Death/N of episodes	Mortality (%) Death/N of episodes	Mortality (%) Death/N of episodes
Internal Medicine	50 31/62	62.5 5/8	0 0/1	48.7 19/39	50 8/16	57.1 4/7	51.1 68/133
Hematology/Oncology	50 4/8		50 3/6	40 2/5		100 2/2	47.6 10/21
Transplant	33.3 4/12	40 2/5		33.3 4/12	0 0/1	50 1/2	34.4 11/32
Intensive Care Unit	45.2 19/42	83.3 5/6	100 2/2	36.4 4/11		0 0/2	47.6 30/63
General Surgery	35.2 12/34	14.3 1/7		18.5 5/27	50 3/6	100 1/1	29.3 22/75
Global	44.3 70/158	50 13/26	55.5 5/9	36.2 34/94	47.8 11/23	57.1 8/14	43.5 141/324



Candidemia a Venezia-Mestre

	n. casi
Rianimazioni	51
Medicine	45
Chirurgie	9
Malattie Infettive	8
Ucic	4
Ematologia	3
Pneumologia	1
Cardiologia	1
Radioterapia	1
	123

Tabella 2 – Distribuzione dei lieviti isolati da emocolture per classi di età

Microorganismo isolato	n° isolati per classi di età' (anni)				Tot. Isolati (%)
	0 - 19	20 - 44	45 - 64	>65	
<i>Candida albicans</i>	-	8	20	31	59 (47,9)
<i>Candida parapsilosis</i>	-	6	4	18	28 (22,8)
<i>Candida glabrata</i>	-	-	5	7	12 (9,7)
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	1	8	9 (7,3)
<i>Geotrichum capitatum</i>	-	-	1	3	4 (3,2)
<i>Candida krusei</i>	-	1	-	2	3 (2,4)
<i>Candida lusitanae</i>	-	-	1	1	2 (1,6)
<i>Cryptococcus humicola</i>	-	-	-	1	1 (0,8)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	1	-	1 (0,8)
<i>Candida kefyr</i>	-	-	-	1	1 (0,8)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	1	-	1 (0,8)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	1	-	-	1 (0,8)
<i>Candida famata</i>	-	-	-	1	1 (0,8)



Candidemia: trattamento

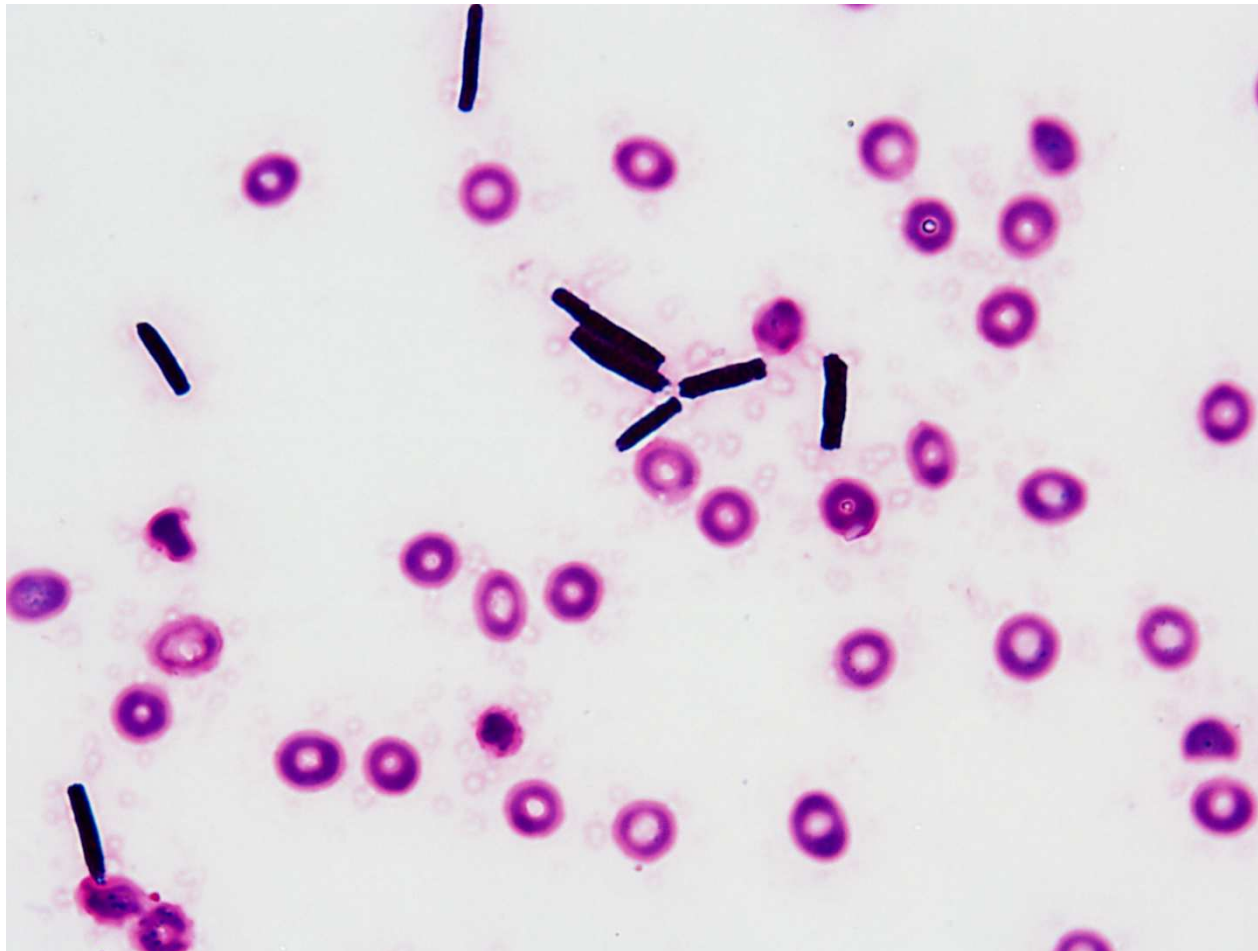
Table 2. Summary of recommendations for the treatment of candidiasis.

Condition or treatment group	Therapy		Comments
	Primary	Alternative	
Candidemia			
Nonneutropenic adults	Fluconazole 800-mg (12-mg/kg) loading dose, then 400 mg (6 mg/kg) daily or an echinocandin ^a (A-I). For species-specific recommendations, see text.	LFAmB 3–5 mg/kg daily; or AmB-d 0.5–1 mg/kg daily; or voriconazole 400 mg (6 mg/kg) bid for 2 doses, then 200 mg (3 mg/kg) bid (A-I)	Choose an echinocandin for moderately severe to severe illness and for patients with recent azole exposure. Transition to fluconazole after initial echinocandin is appropriate in many cases. Remove all intravascular catheters, if possible. Treat 14 days after first negative blood culture result and resolution of signs and symptoms associated with candidemia. Ophthalmological examination recommended for all patients.
Neutropenic patients	An echinocandin ^a or LFAmB 3–5 mg/kg daily (A-III). For species-specific recommendations, see text.	Fluconazole 800-mg (12-mg/kg) loading dose, then 400 mg (6 mg/kg) daily; or voriconazole 400 mg (6 mg/kg) bid for 2 doses then 200 mg (3 mg/kg) bid (B-III)	An echinocandin or LFAmB is preferred for most patients. Fluconazole is recommended for patients without recent azole exposure and who are not critically ill. Voriconazole is recommended when additional coverage for molds is desired. Intravascular catheter removal is advised but is controversial.

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Candidemia





...The need for speed in medicina

- Diarrea nell'anziano
- TBC nell'anziano
- Esame microscopico con col. di Gram
- **Polmonite nell'anziano**



Polmoniti Alveolari

Polmonite Pneumococcica

Epidemiologia: Popolazione generale: 2 casi/1000/anno

Anziani: 14 casi/1000/anno

Reclute: 25 casi/1000/anno

Trapiantati renali: 37 casi/1000/anno

Imbianchini: 42 casi/1000/anno

Minatori del Sud Africa: 90 casi/1000/anno

Modalità infezione: Pneumococchi presenti nel faringe: 60% bambini
25% adolescenti
5% adulti

Stagionalità: Soprattutto Inverno - Primavera



Polmoniti Alveolari

Polmonite Pneumococcica

Dati di laboratorio

- Leucocitosi neutrofila (15000-30000/mmc)
- Aumento della bilirubina (<3-4 mg/dl)
- Emocolture positive nel 5-25% dei casi
- Es. batterioscopico e colturale dell'escreato: utile se campione è idoneo e analizzato da mani esperte
- Antigene urinario

Rx torace

- Addensamento di grado variabile; oggi raro di tipo lobare
- Versamenti pleurici (25-60% dei casi)
- Ascessi (25% delle forme stafilococciche)

Complicanze

- CID
- Sepsi fulminante (soggetti splenectomizzati)
- Meningite
- Ascessi cerebrali
- Endocarditi

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive

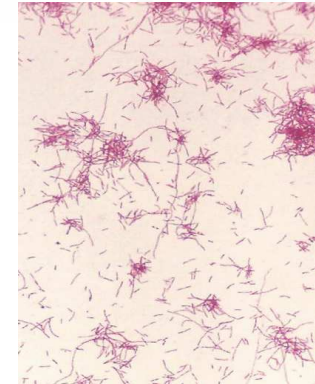


3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Polmoniti Alveolari

Polmonite da *Legionella*



Epidemiologia:

Microrganismo ubiquitario (acque, terreno).

Infezione ubiquitaria: forme asintomatiche

forme similinfluenzali

polmonite con o senza interessamento sistemico

Fonte di infezione:

Ubiquitaria (aerosol di docce o rubinetti, nebulizzatori, umidificatori)

Fattori favorenti la malattia:

Fumo di sigaretta, pneumopatie croniche, età avanzata, abuso di alcol, stati di immunodeficit

Incubazione:

2-10 giorni



Polmonite da *Legionella*

Diagnosi

- Difficile clinicamente
- Es. colturale dell'escreato o da BAL, Ab monoclonali, sierologie (IF o ELISA)
- Antigene urinario

Rx torace

- Infiltrato tipicamente alveolare, soprattutto a carico dei lobi inferiori, di tipo segmentario o lobare, monolaterale o diffuso, con evoluzione all'addensamento. Possibile interessamento interstiziale.
- Versamento pleurico nel 25-65% dei casi
- Completa risoluzione radiologica in 1-4 mesi

Terapia

- Azitromicina (1 g in dose unica, poi 500 mg/die)
- Claritromicina (500 mg ogni 12 h)
- Levofloxacinina (1 g in dose unica poi 500 mg/die)
- Risposta alla terapia in 3-5 giorni
- Da continuare per 10-14 giorni (3 settimane nei casi più gravi)



Indagini microbiologiche

- Esame microscopico diretto su escreato, BAL e liquido pleurico per ricerca del BK
- Esame colturale su escreato, BAL e liquido pleurico
- Emocoltura: positività dell'emocoltura tra il 14 e il 17%
- Sierologia: per mycoplasma pneumonie
- Antigeni urinari precoci per legionella e pneumococco

L'etiologia è sconosciuta nel 40% dei casi

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Antigeni urinari

L. pneumophila & S.pneumoniae

Sensibilità: 95%
Specificità: 95%
Accuratezza: 95%

Limite:
solo sierogruppo 1



Sensibilità: 86%
Specificità: 94%
Accuratezza: 93%

Limite:
infezioni vie urinarie
(cross reattività)



Ma ... vedi NEQAS

Comments

Specimen 1127: Some 79% (211/267) of participants correctly detected *Legionella pneumophila* antigen. The kits used by the 56 participants reporting a negative result were: ACCUSAY Legionella (1), BinaxNOW (32), Xpect Legionella (5), SAS Legionella V Test and Mascia Brunelli (1). Fourteen participants determined an equivocal result; of these, eight laboratories reported the final result as positive and six laboratories reported a negative result. Participants using BinaxNOW should note that according to the manufacturer's instructions any visible line should be reported as positive. As there was less than 80% concordance this specimen was not scored.

Specimen 1128: Participant performance was very good with 96% (258/268) of participants correctly detecting *Legionella pneumophila* antigen.

Specimen 1129: An excellent performance where 99% (264/268) of participants correctly detected *Legionella pneumophila* antigen.

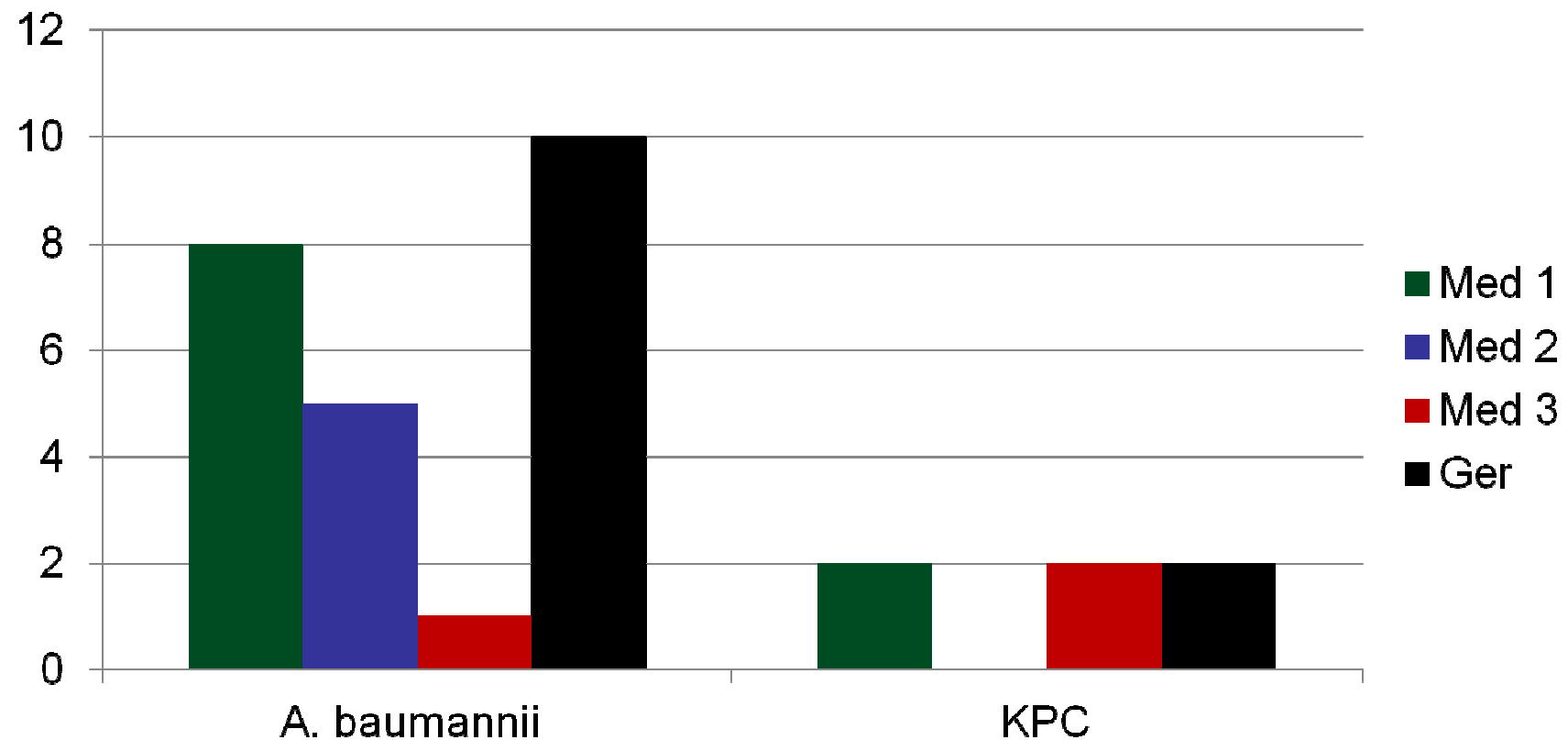


...The need for speed in medicina

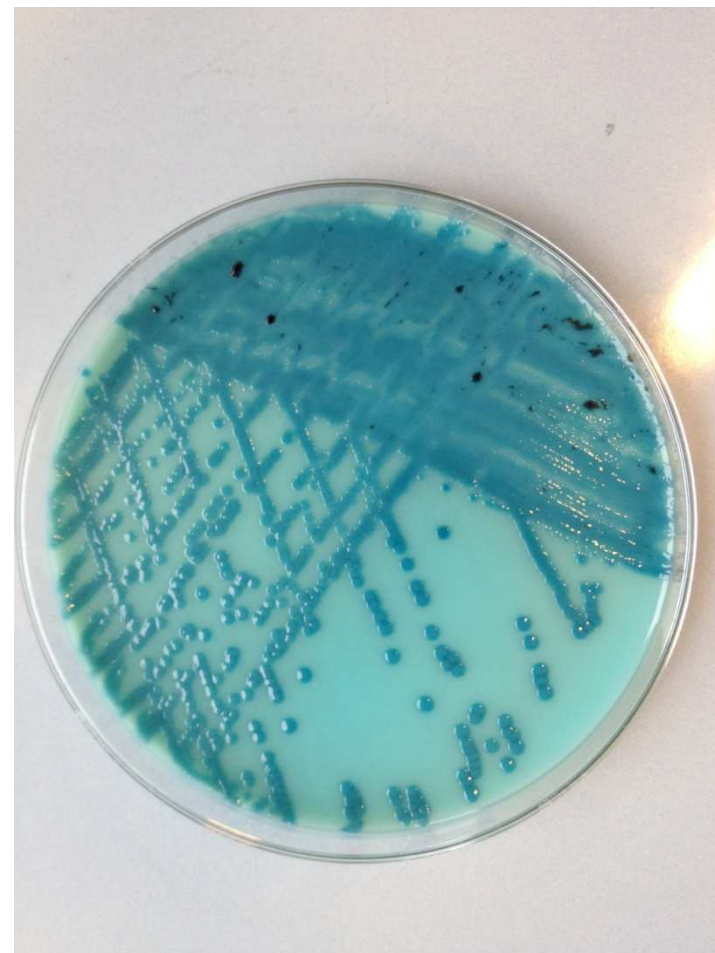
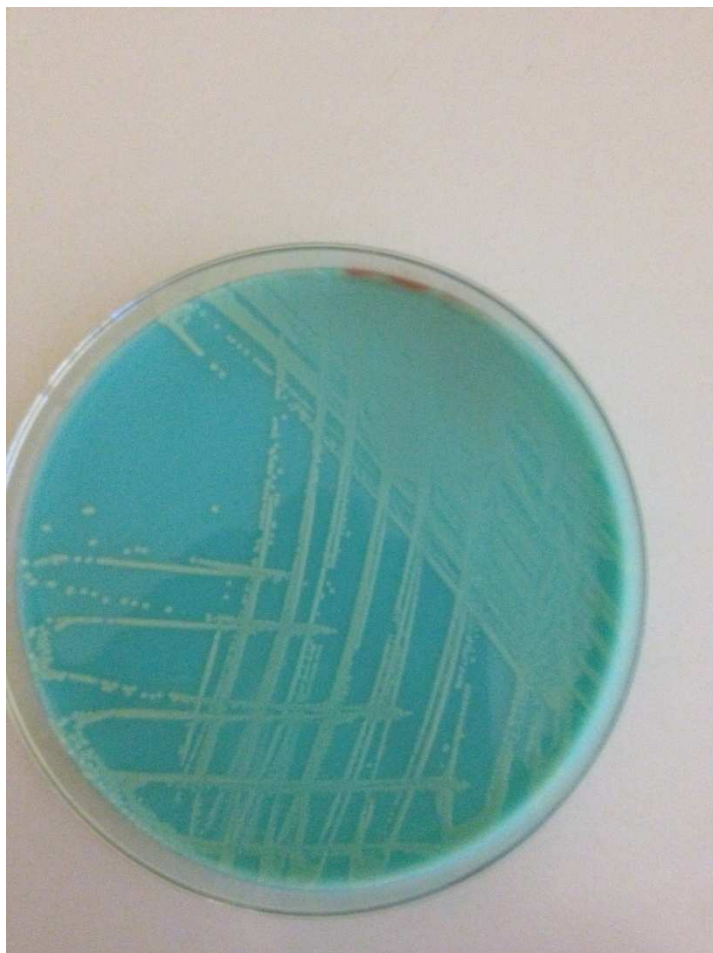
- Diarrea nell'anziano
- TBC nell'anziano
- Polmonite nell'anziano
- **MDROs nell'anziano**



MDROs Medicine Mestre 2012



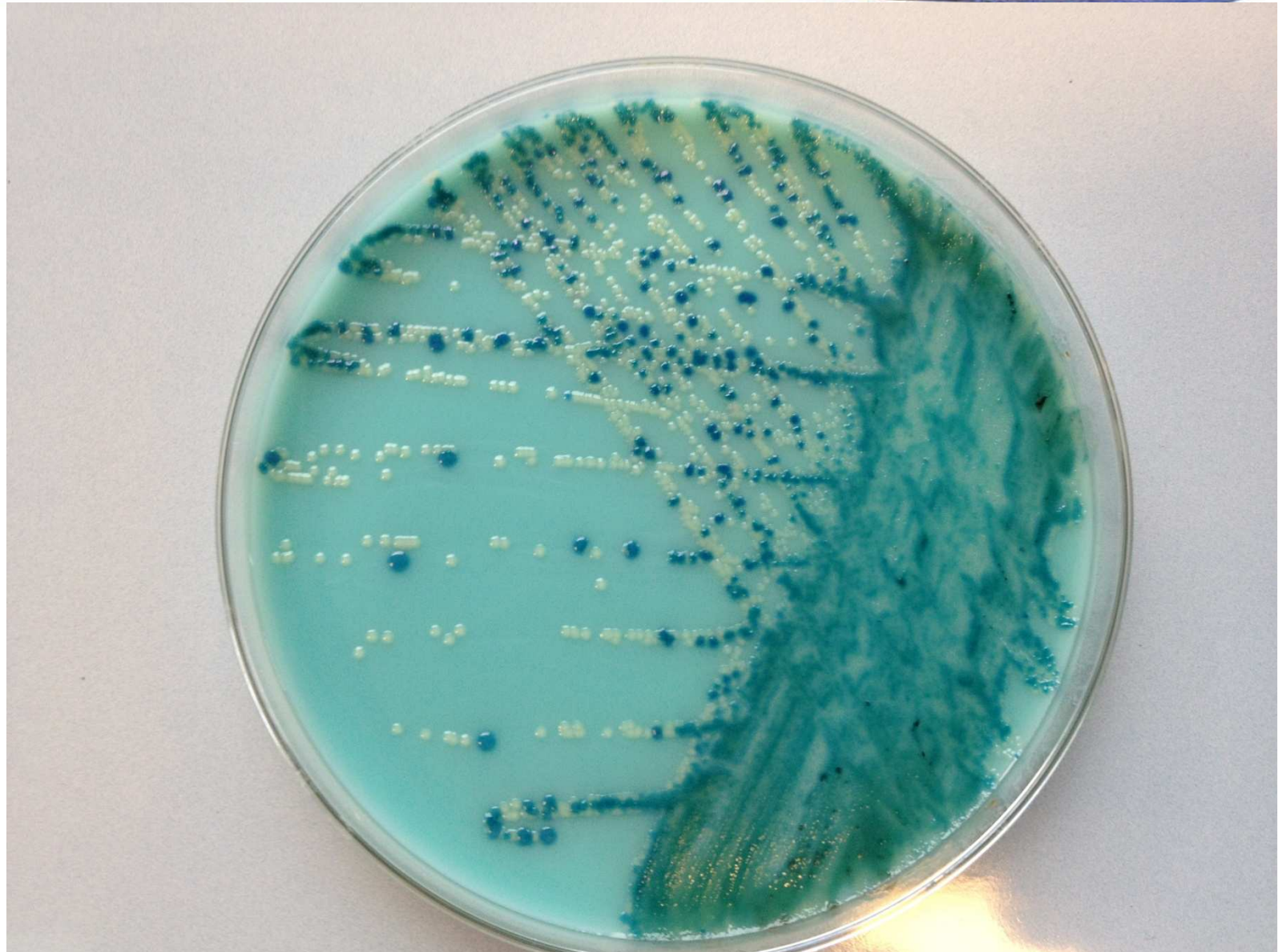
3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive

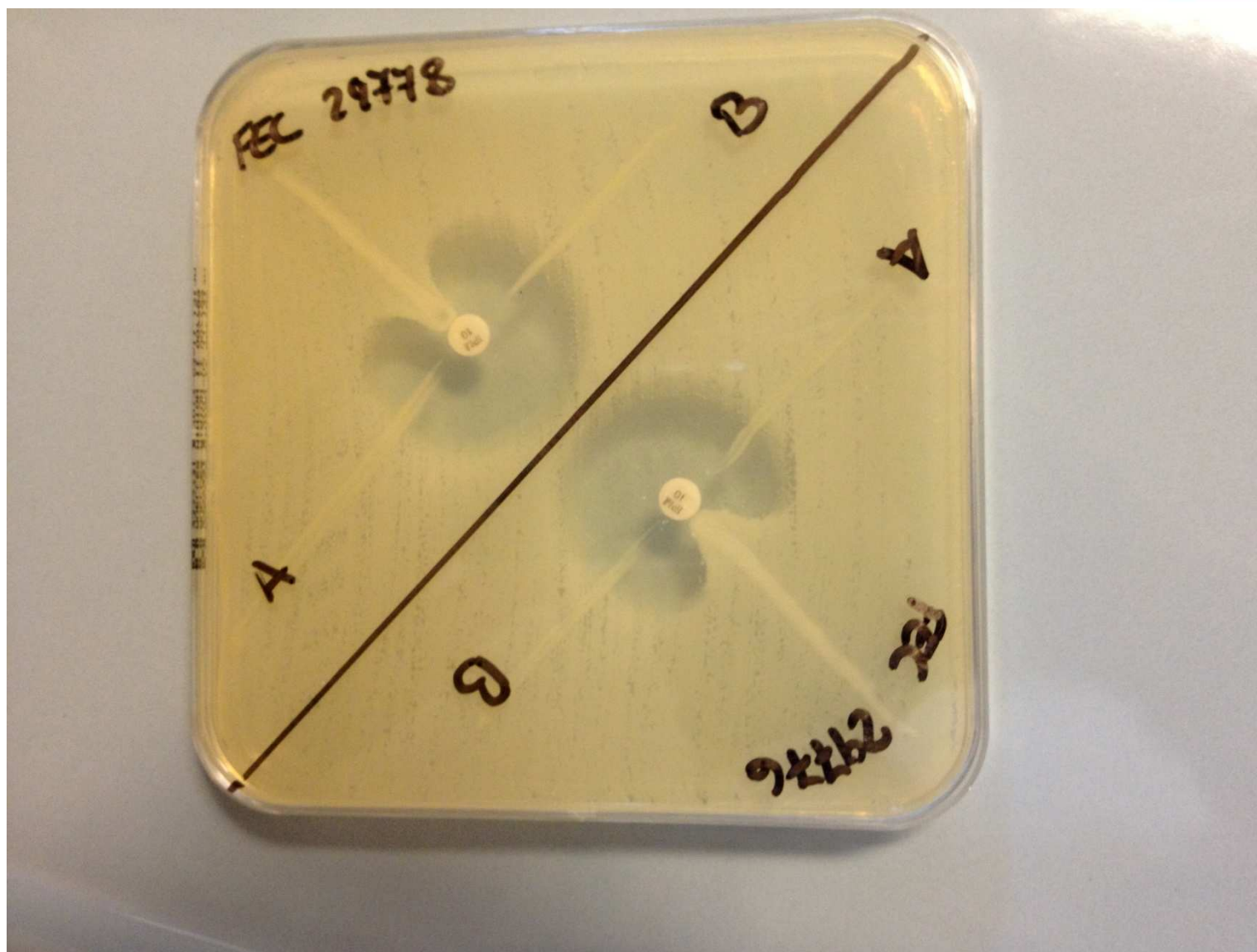


Se poi uno
è
sfortunato
...



3° CONGRESSO NEWMICRO

...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Ma...

- **Non è tutto oro ... quel che sembra ...**

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Nome paziente:

Gruppo di isolati: fec28904-1

ID paziente:

Bionumero: 6607734653564010

Organismo selezionato: Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae

Informazioni sull'antibiogramma			Card:	AST-N089	Numero di lotto:	349239140	Scade:	1-lug-2013 13:00 CEST
			Completato :	27-dic-2012 20:21 CET	Stato:	Finale	Tempo di analisi:	7,25 ore
Antimicrobico	MIC	Interpretazio ne	Antimicrobico	MIC	Interpretazio ne			
ESBL	POS	+	Meropenem	<= 0,25	S			
Ampicillina	>= 32	R	Amikacina	<= 2	S			
Amoxicillina/acido clavulanico	>= 32	R	Gentamicina	<= 1	S			
Piperacillina/tazobactam			Tobramicina	8	R			
Cefotaxime	>= 64	R	Ciprofloxacina	2	R			
Ceftazidime	>= 64	R	Levofloxacina	1	S			
Cefepime	>= 64	R	Tigeciclina	2	I			
Ertapenem	<= 0,5	S	Colistina	<= 0,5	S			
Imipenem	<= 1	S	Trimetoprim/Sulfametossazolo	>= 320	R			

+= Antibiotici dedotti *= Modificato AES **= Modificato utente

+= Antibiotici dedotti *= Modificato AES **= Modificato utente

Conclusioni AES:		Ultima modifica: 10-feb-2012 13:42 CET	Set di parametri: VT2 EUCAST 2012 + ESPERTO ER
Livello di affidabilità:	Incoerente		

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Ed ora ...

The need for speed:

Ci siamo dilungati anche troppo,
la velocità non è il nostro forte,

ci scusiamo e ...

ci togliamo dai piedi:

**GRAZIE PER L'ATTENZIONE
e della pazienza!!**

