

Dr. Claudio Piersimoni
A. O. U. Ospedali Riuniti
Ancona

Diagnostica microbiologica: appropriatezza ed efficienza

Ferrara, 21 settembre 2013



Ruolo dei test microbiologici

- Diagnosi eziologica

- A. metodi rapidi (crescita-indipendenti) rilevano:

- bacilli alcool-acido resistenti (microscopia) soglia: 10^4 cfu/ml

- genoma batterico (amplificazione) soglia: 10^2 cfu/ml

- B. metodi convenzionali (crescita-dipendenti)

- coltura (terreni liquidi) soglia 10^1 cfu/ml

Ruolo dei test microbiologici

- Identificazione

- A. aumento del numero di specie patogene

- B. valutazione della significatività clinica

Ruolo dei test microbiologici

- Guida nella scelta della terapia
 - A. correlazione fra dati *in-vitro* ed *outcome* dei pazienti affetti da TB
 - B. numero limitato di farmaci antitubercolari
 - C. aumento delle resistenze singole e multiple
 - i. DST fenotipico
 - ii. DST genotipico (ricerca delle mutazioni correlate alla farmacoresistenza)

Limiti del laboratorio

- Posizione secondaria nei livelli decisionali
 - A. mancato riconoscimento della malattia
 - i. Ridotta incidenza di TB nei paesi industrializzati
 - ii. Ridotta familiarità e competenza con le infezioni da micobatteri (patomorfosi)
 - B. invio in laboratorio di campioni non idonei
 - C. richiesta di test non utili: capacità intrinseca di un test di modificare l'iter decisionale in senso diagnostico o terapeutico

Requisiti per una diagnostica di qualità

1. preanalitica orientata alla appropriatezza
2. tecniche diagnostiche moderne
3. binomio esperienza-competenza
4. servizio fornito in tempi clinicamente utili
5. rispondente a criteri di costo-efficacia
6. rispettoso della sicurezza degli operatori

La preanalitica

SELEZIONE DEL PAZIENTE

- A. localizzazione del processo patologico
- B. scelta della sede del prelievo

SELEZIONE DEL CAMPIONE

- A. raccolta
- B. trasporto
- C. conservazione

La sintomatologia

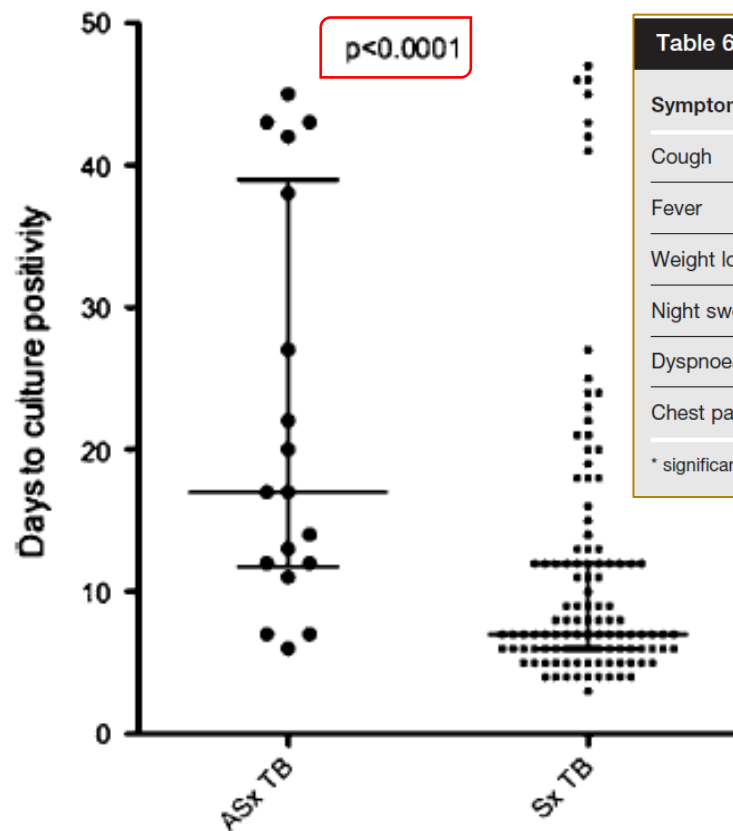


Table 6 Classic symptoms of tuberculosis

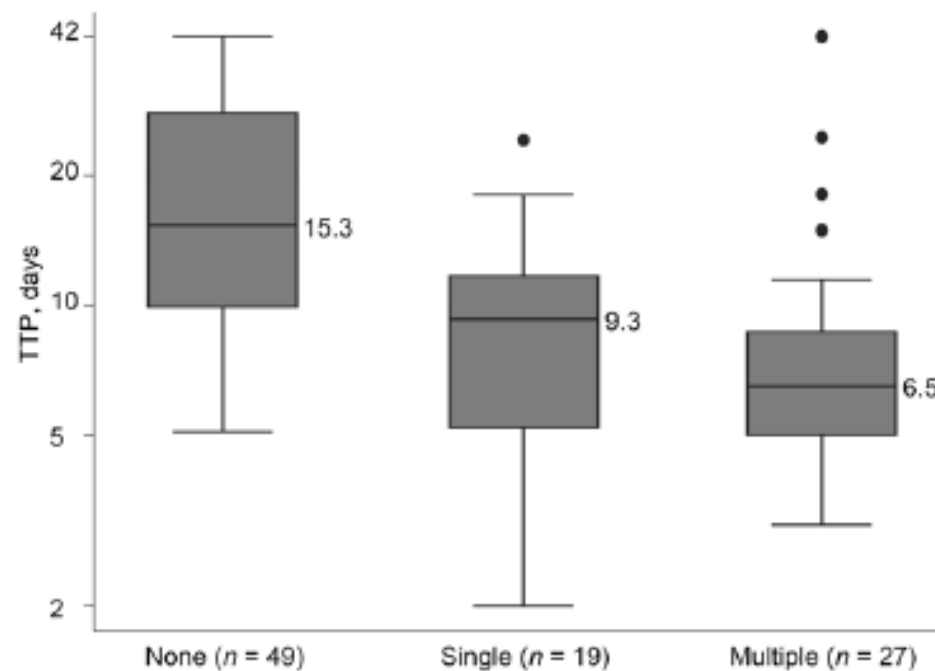
Symptom	TB (n=47)	Non-TB (n=516)	Odds ratio (95% CI)
Cough	81%	77%	1.27 (0.58–2.69)
Fever	70	59	1.64 (0.85–3.15)
Weight loss	64	27	4.74 (2.53–8.86)*
Night sweats	55	27	3.29 (1.79–6.04)*
Dyspnoea	47	50	0.88 (0.48–1.60)
Chest pain	27	26	1.08 (0.55–2.11)

* significant difference

Thorax 2011;**66**:669–673.

Correlazione Rx/coltura

INT J TUBERC LUNG DIS 14(12):1596-1602
© 2010 The Union



Use of clinical risk assessments in evaluation of TB suspected patients

Characteristic	HIV+		Other patients	
	TB (n = 14) %	Not TB (n = 89) %	TB (n = 58) %	Not TB (n = 177) %
Symptoms and signs				
Cough	79	85	90*	64
Weight loss	50	51	64*	34
Fever	71	72	64*	41
Suggestive CXR	57*	18	72*	39
AFB smear	36 [†]	16	66*	5
Epidemiologic risks				
PPD+	43*	10	43	42
Homeless and drug or alcohol abuse	21	7	9	12
Foreign-born	21 [†]	8	41	41

* $P < 0.01$; [†] $0.05 < P < 0.10$ (univariate logistic regression).

Suggestive CXR = chest X-ray pattern consistent with current active pulmonary disease; AFB = acid-fast bacilli; PPD = purified protein derivative.

Non dimentichiamo le eccezioni!

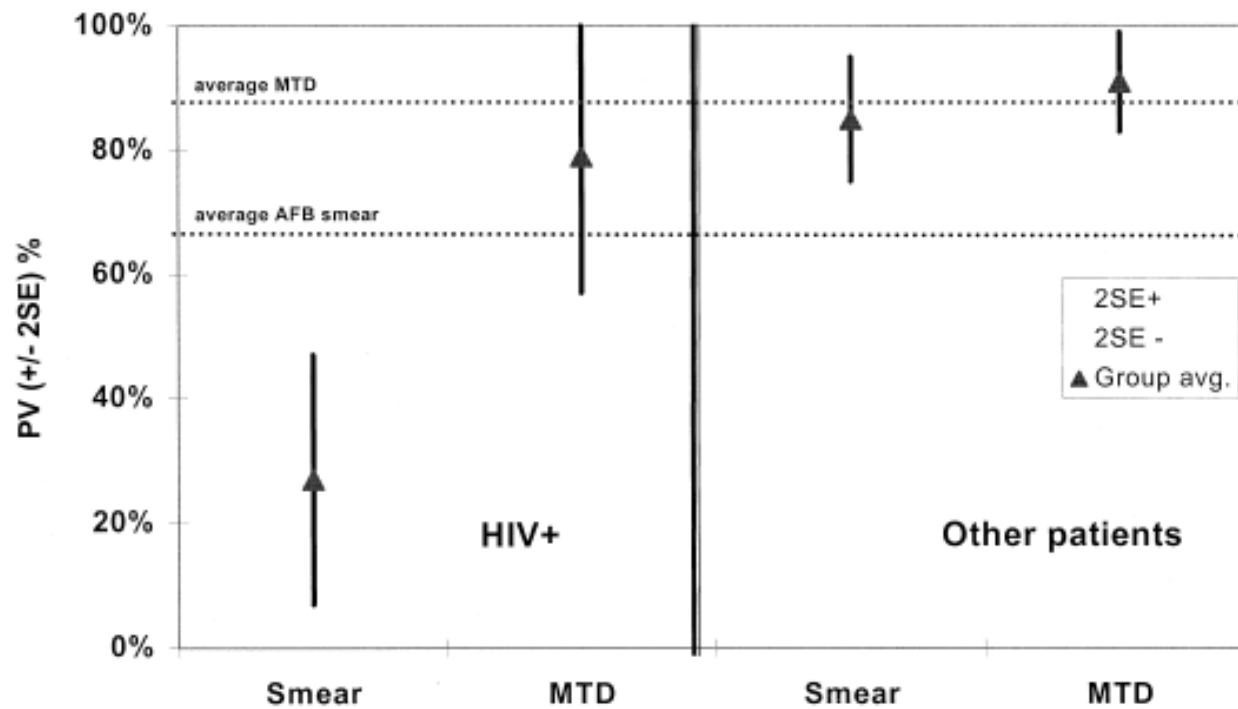
- Soggetti HIV positivi ($< 100 \text{ CD}_4$)
- Bambini
- Soggetti immunodepressi iatrogeni
 - trapianti di organi solidi (SOT)
 - soggetti trattati con farmaci biologici

Utilità clinica dei DAT

Sospetto clinico	Microscopia	Diagnosi di TB	Utilità dei DATs
Alto	Positiva	Agevole	Limitata
Alto	Negativa	Presuntiva	Alta
Basso	Positiva	Incerta	Alta
Basso	Negativa	Improbabile	Bassa

Use of clinical risk assessments in evaluation of TB suspected patients

VALORE PREDITTIVO POSITIVO DI MICROSCOPIA ED AMPLIFICAZIONE GENICA



INT J TUBERC LUNG DIS 2000; 4: S34–S40

Better patient instruction for sputum sampling can improve microscopic tuberculosis diagnosis

B. Alisjahbana,* R. van Crevel,[†] H. Danusantoso,[‡] T. Gartinah,[§] E. S. Soemantri,*[†] R. H. H. Nelwan,[¶]
J. W. M. van der Meer[†]

Table 2 Diagnostic yield and sputum sample characteristics

	Control group (n = 93) n (%)	Intervention group (n = 81) n (%)
Patients		
→ ZN-positive*	33 (35)	41 (51)
First sputum sample positive*	24 (26)	37 (46)
Second sputum sample positive*	29 (31)	32 (40)
Third sputum sample positive*	25 (27)	33 (41)
Sputum samples		
→ Volume >5 cc*	6 (2.2)	55 (23.3)
Colour not clear (white, green, red)*	222 (82.5)	212 (89.8)
Thick consistency	129 (48.0)	124 (52.5)
Presence of blood*	5 (1.8)	19 (8.0)
Density of AFB on sputum smear [†]		
0	195 (72.5)	143 (60.6)
+	43 (16.0)	30 (12.7)
++*	17 (6.3)	32 (13.6)
+++*	14 (5.2)	31 (13.1)
→ Any positive*	74 (27.3)	93 (39.4)

* Significant difference between groups; $P < 0.05$ (χ^2 , two-sided).

[†]The Union grading system was used to quantify AFB.[§]

ZN = Ziehl-Neelsen; AFB = acid-fast bacilli.

TB extrapulmonare

NICE clinical guideline 117

Site	Clinical signs	Imaging	Biopsy	Culture
Lymph node	Lymph node enlargement	Ultrasound	Node	Biopsy or aspirate
Pleura	Pleural effusion	Plain X-ray and computed tomography (CT)	Pleura	Biopsy Sputum Pleural fluid
Bone/joint	Involvement of weight-bearing joints (spine, hip and knee)	Plain X-ray and computed tomography (CT) Magnetic resonance imaging (MRI)	Site of disease	Biopsy Site abscess Joint fluid
Gastrointestinal	Abdominal pain Symptoms of intestinal obstruction	Ultrasound CT abdomen Endoscopy	Omentum Bowel	Biopsy Ascites
Genitourinary	Local signs and symptoms	Intravenous urography Ultrasound	Site of disease	Early morning urine Biopsy Endometrial curetting
Disseminated	Involvement of 2 or more non-contiguous sites Miliary TB	High-resolution CT thorax Ultrasound abdomen	Lung Liver Bone marrow	Bronchial washing Liver Bone marrow Blood
Central nervous system	Meningitis Neurologic abnormalities	CT brain MRI	Tuberculoma	Biopsy Cerebrospinal fluid
Skin	Ulcerative lesions Local signs and symptoms		Site of disease	Biopsy Site abscess
Pericardium	Pericardial effusion	Echocardiogram	Pericardium	Biopsy Pericardial fluid

La pleurite tubercolare

Quadri Clinici

- pleurite tubercolare (frequente)
- empiema tubercolare (raro)

Arch Intern Med. 1998;158:2017-2021

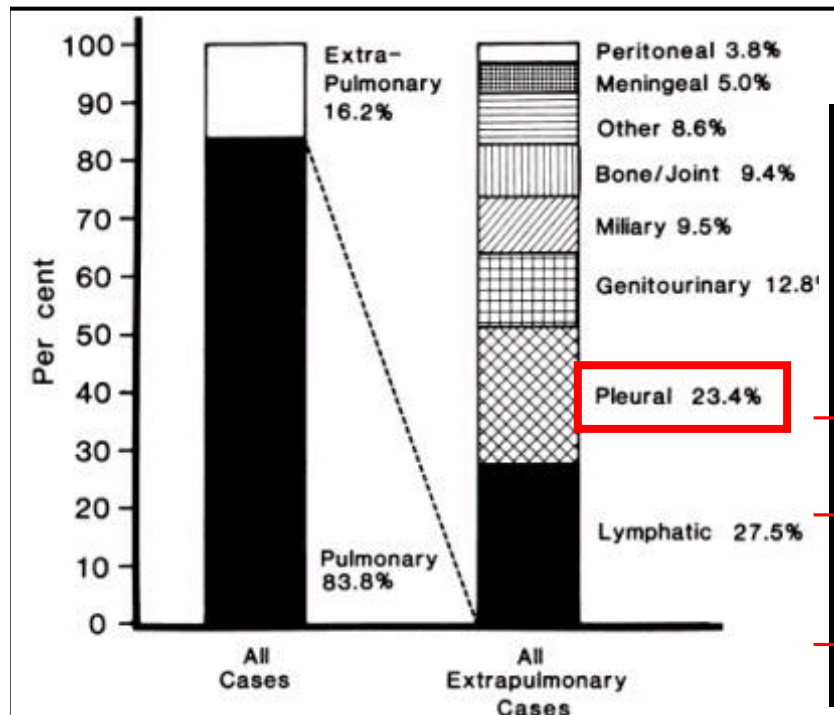
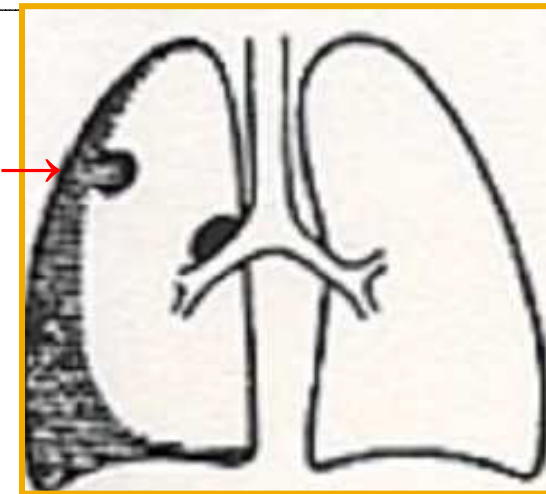
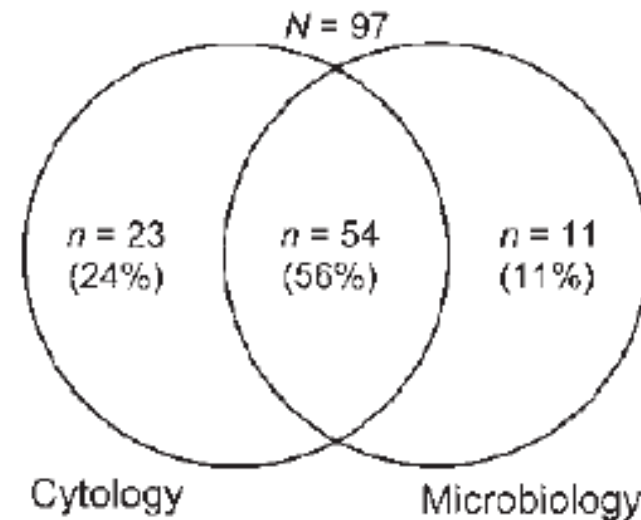


Table 2. Sensitivity of Each of the Criteria Used for Definitive Diagnosis of Tuberculous Pleurisy

Criteria	No. (%)
Ziehl-Neelsen staining of pleural fluid	14/254 (5.5)
Culture of pleural fluid in Lowenstein medium	93/254 (36.6)
Ziehl-Neelsen staining of biopsy tissue	64/248 (25.8)
Culture of biopsy tissue in Lowenstein medium	140/248 (56.4)
Observation of caseating granulomas	198/248 (79.8)
Ziehl-Neelsen staining of sputum	30/48 (62.5)
Culture of sputum in Lowenstein medium	48/48 (100.0)

Agoaspirato con ago sottile

- A. è molto efficace nella diagnosi delle linfadeniti
- B. riduce la necessità di procedure più invasive
- C. nel sospetto di una micobatteriosi, associare sempre alla citologia la ricerca colturale

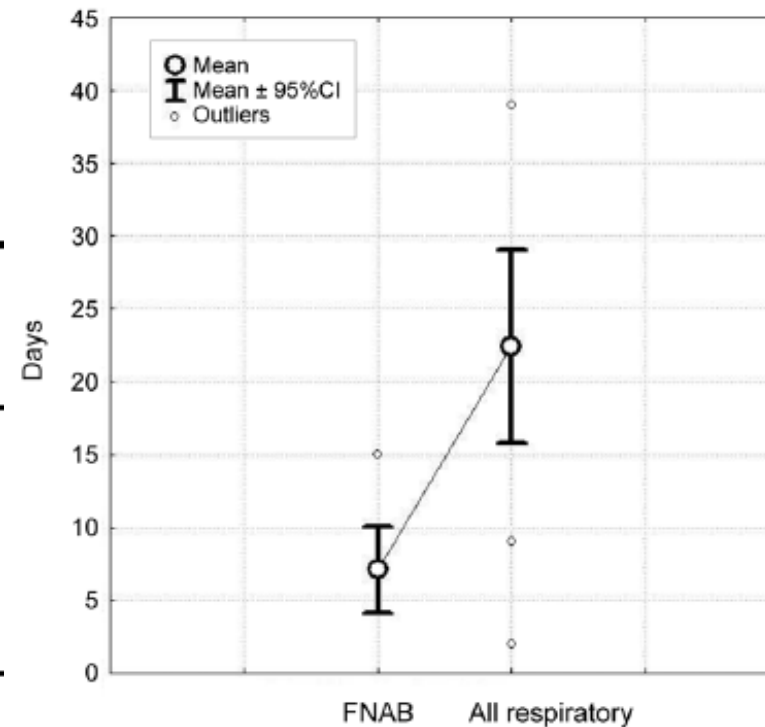


Int J Tuberc Lung Dis 2010; 14: 93-98

Agoaspirato con ago sottile

è più sensibile dei materiali respiratori nella diagnosi di TB pediatrica

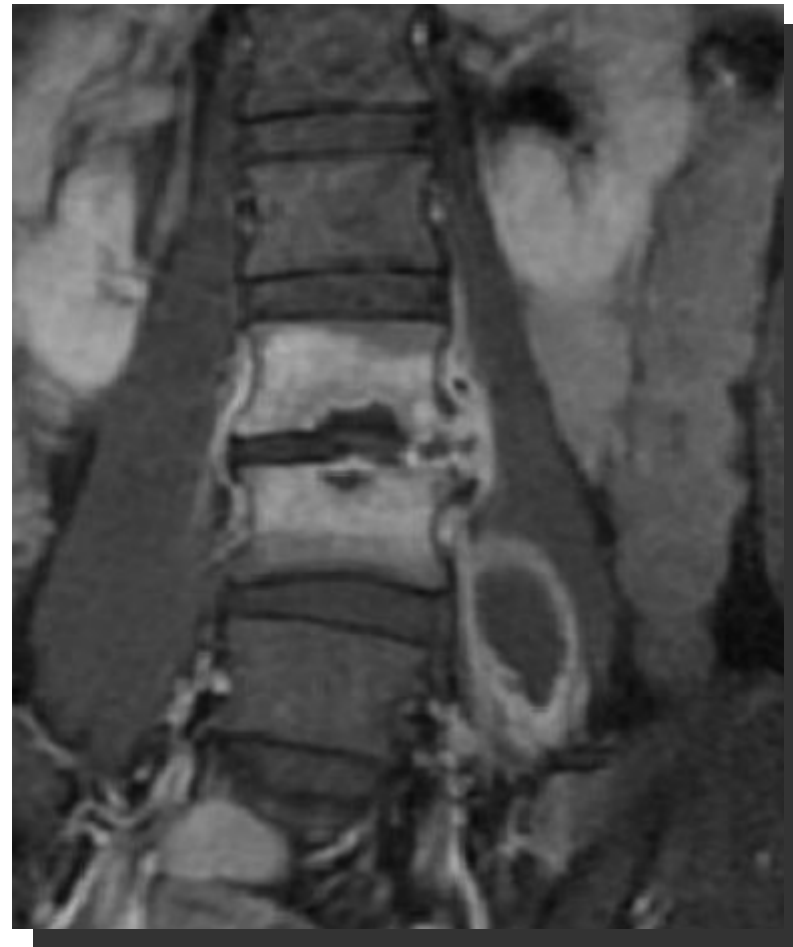
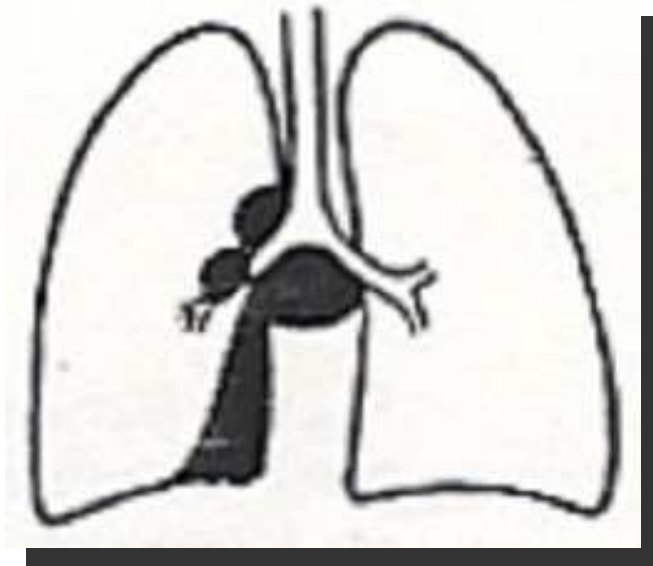
Specimen type	Total <i>n</i>	Culture- positive <i>n</i> (%)
FNAB	95	51 (54)
Gastric aspirates	143	39 (27)
Induced sputum	15	6 (40)
Expectorated sputum	11	5 (45)
Nasopharyngeal aspirates	10	5 (50)
Non-respiratory	26*	3 (12)



Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13: 1373-1379

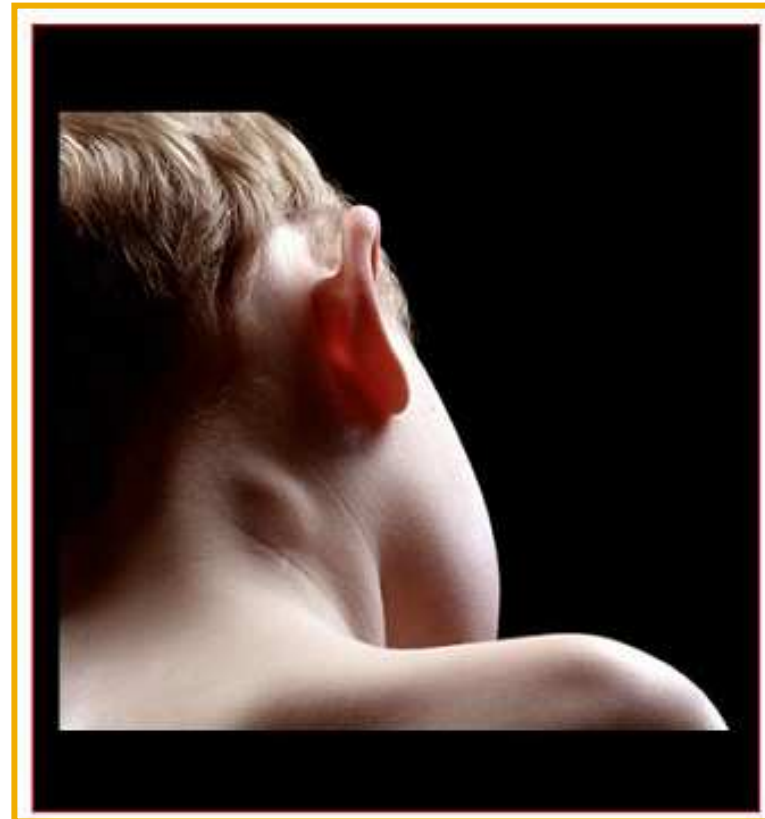
Agoaspirato con ago sottile

è indispensabile nelle localizzazioni ai linfonodi dell'ilo polmonare ed anche in altre sedi



Tessuti

- A. colmare il *gap* culturale a sfavore della coltura
- B. i frammenti chirurgici adeguatamente trattati (omogeneizzazione) forniscono un'alta resa diagnostica



La omogeneizzazione

- Omogeneizzatori meccanici

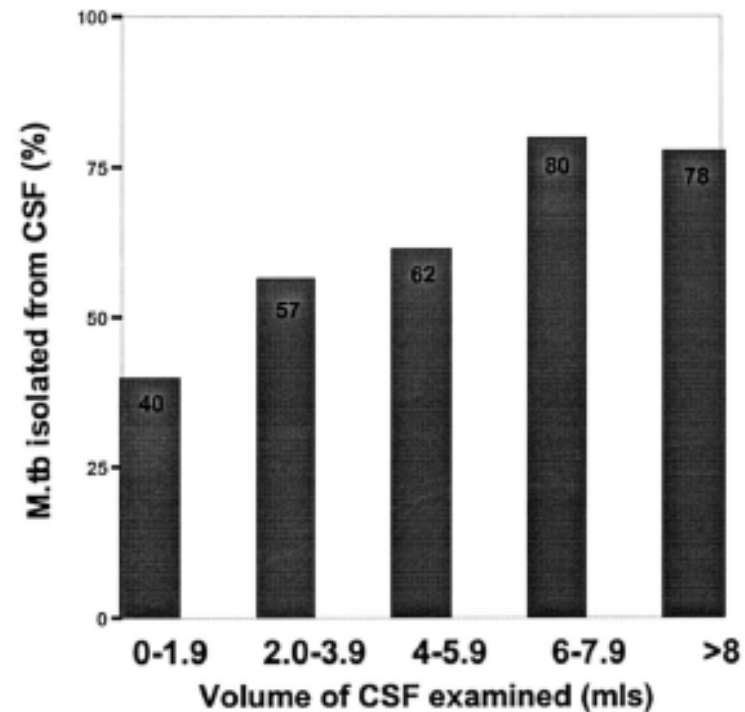


- Omogeneizzatori ad ultrasuoni



Liquor cefalo-rachidiano

- A. evitare la *spalmatura* diagnostica
- B. privilegiare i test più sensibili
- C. per una diagnostica completa servono almeno 2.0 mL di LCR



J. Clin. Microbiol. 2004; 41: 378-379

Urine

culture is done only if there is sterile pyuria in patients with a clinically sound suspect of genito-urinary TB

Urine con coltura positiva per MTB	Forme cliniche di tubercolosi	
	Polmonare	Genito-urinaria
Totale pazienti	22	7
Sintomi d'organo	0	7
Piuria ($\geq 10^3$ /ml)	2	4
BAAR urine	1	2
MTB nelle urine	22	7
MTB nell' escreato	22	0

BMJ 1996; 312: 27

Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe

F.A. Drobniowski*, **S. Hoffner[#]**, **S. Rusch-Gerdes[†]**, **G. Skenders⁺**,
V. Thomsen[§] and the **WHO European Laboratory Strengthening Task Force**

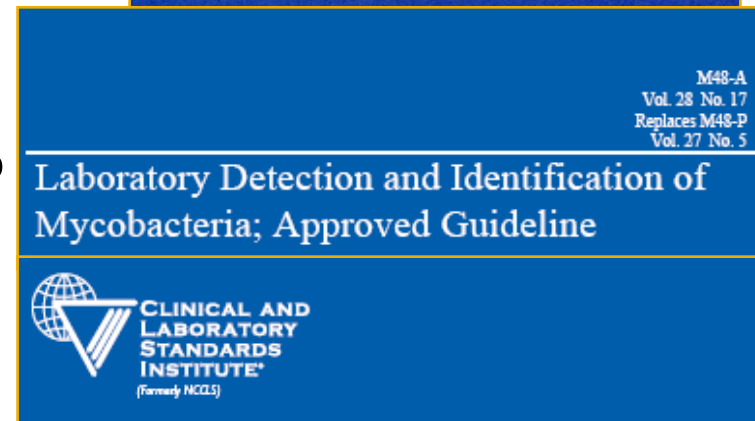
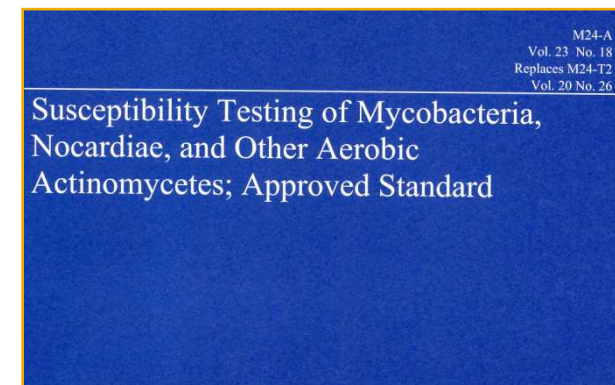
Eur. Respir. J. 2006; 28: 903-909

There is little or no value in performing microscopic examination of urine samples (except where there is a **strong suspicion** of renal TB) and this practice should be discontinued.

Urine samples should only be cultured where there is a **clear suspicion** of renal TB.

Gli standard diagnostici

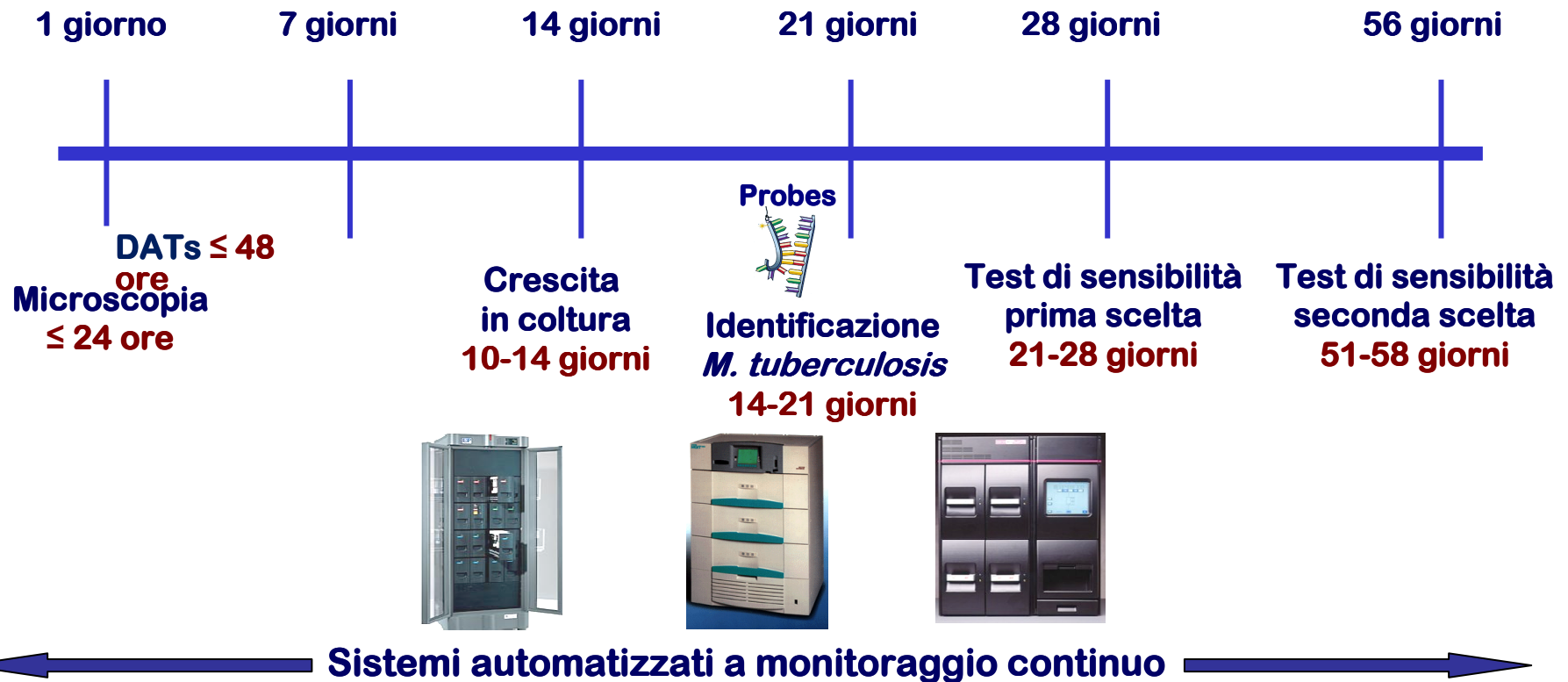
1. **Microscopia:** fluorocromi
2. **Amplificazione:** metodi dotati di CIA
3. **Esame colturale:** terreno liquido + terreno solido
4. **Identificazione:** metodi molecolari
5. **Antibiogramma:** in terreno liquido
6. **Controllo di qualità:** su ogni attività diagnostica



Indicazioni all'uso dei DAT

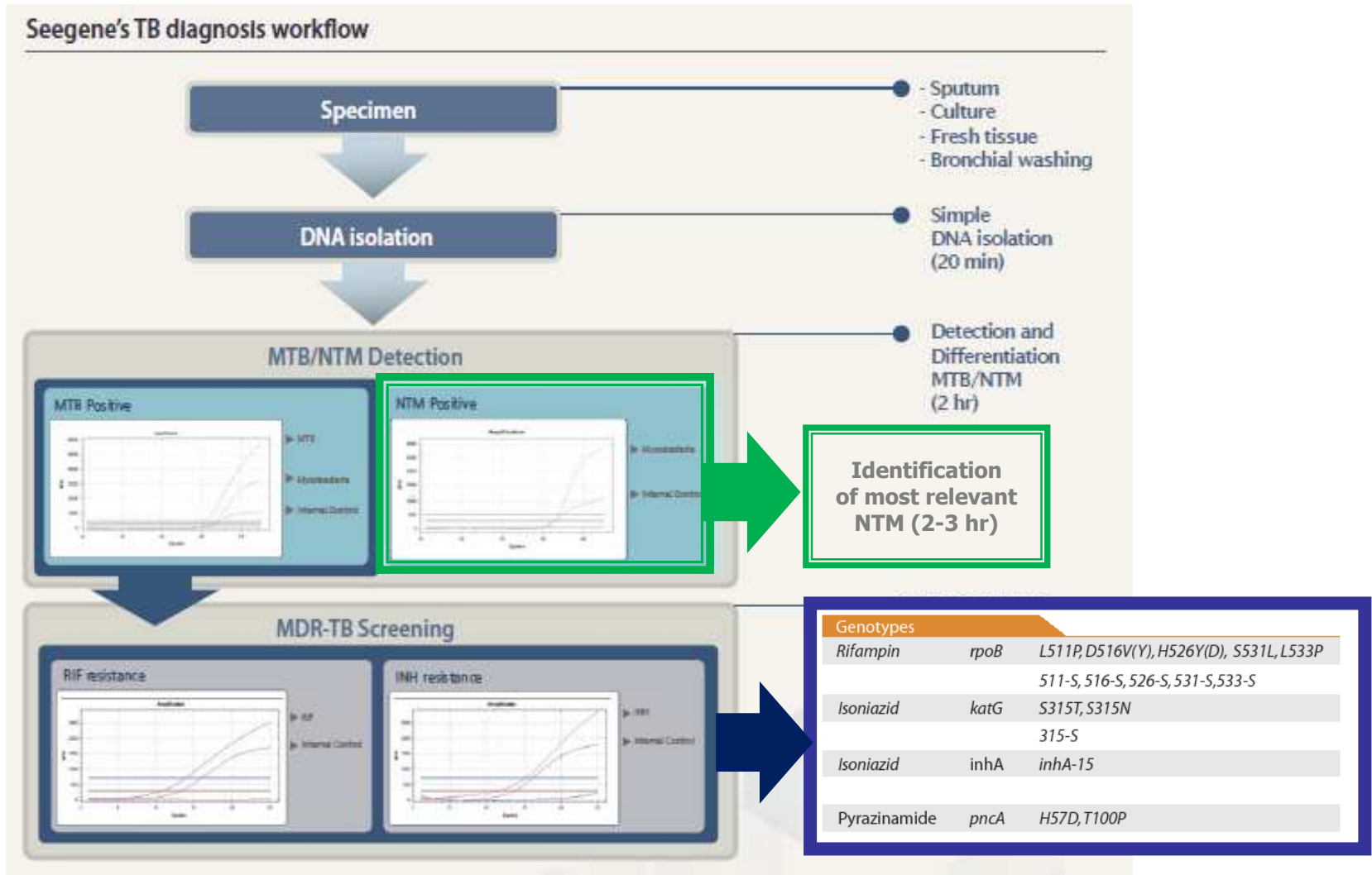
- A. impiego mirato sulla base di un congruo sospetto clinico
 - I. servono a confermare la TB (**ruling in**)
 - II. NON servono ad escluderla (**ruling out**)
- B. la resa diagnostica del test dipende in larga misura da:
 - I. qualità del campione
 - II. appropriatezza della sede di prelievo

Tempi di refertazione (TATs)



Am.J.Respir.Crit.Care Med.2005; 172: 1169-1227

Il futuro è già qui



La sierologia

WHO recommends against inaccurate tuberculosis tests

Misleading serology tests for tuberculosis could be worsening the epidemic in some high-burden countries. WHO will be issuing policy advice against their use in early 2011. Kelly Morris reports.

Lancet 2011; 377: 113-114

“Manufacturers continue to claim that their tests are effective and fill a diagnostic niche, especially in sputum smear-negative patient groups.”