

relazioni

SESSIONE I

Appropriatezza e nuovi standard tecnologici in Microbiologia

*Mercoledì 15 ottobre 2003, 9.00-13.00, Sala Michelangelo
Palazzo dei Congressi, piano -I*

S1.1

STANDARD E STANDARDIZZAZIONE NELLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA

Spanò A.

Laboratorio di Microbiologia, Ospedale S. Pertini, Roma

L'impatto delle biotecnologie in diagnostica si è innanzi tutto avvertito nel settore delle malattie infettive, sia di origine virale che batterica.

La microbiologia tradizionale permette di isolare e identificare batteri, micoplasma, lieviti e virus responsabili delle infezioni umane attraverso la coltura, l'esame diretto al microscopio e prove biochimiche. Per la rivelazione delle infezioni virali (ma anche batteriche), si sono comunemente utilizzati gli immunodosaggi sierologici che permettono di misurare gli anticorpi specifici circolanti. Gran parte dei più importanti agenti infettanti sono attualmente diagnosticabili in modo più rapido e sensibile mediante le tecniche di amplificazione molecolare. In particolare, l'introduzione di kit diagnostici commerciali ha reso possibile l'impiego routinario della PCR e delle altre tecniche di analisi molecolare nei laboratori di diagnostica clinica. Terreni, reagenti e strumentazione automatica dedicata per tecniche colturali, immunoenzimatiche e di amplificazione completano il quadro di quanto comunemente utilizzato in un laboratorio di microbiologia.

Le questioni cruciali per la rivelazione di un'infezione sono la sensibilità e la velocità di rivelazione necessarie per il microrganismo che ne è responsabile. Anche se la tendenza è quella di riuscire a disporre di metodi sensibili che permettano di ottenere risposte il più possibile rapide, magari entro le 24 ore dal prelievo, in modo da consentire un precoce inizio della terapia, esistono microrganismi per i quali un'elevata sensibilità e/o rapidità sono più o meno importanti. In questa otti-

ca, questioni chiave sono rappresentate dall'economicità e dalla possibilità di standardizzare e automatizzare un dato test, in modo da renderlo adeguato ad uso routinario nella pratica clinica.

Una tipica sequenza utilizzata in microbiologia è rappresentata da raccolta e trasporto del campione, arricchimento, semina, incubazione, isolamento delle colonie, identificazione batterica e/o virale, antibiogramma. Per l'identificazione del microrganismo si utilizza l'esame microscopico diretto, metodi di identificazione immunologica, o basati sull'espressione di un antigene o produzione di un enzima, identificazione di sequenze genetiche di DNA o di rRNA (RNA ribosomiale) specifiche per i singoli microrganismi.

La diagnostica microbiologica sta attraversando una nuova grande trasformazione grazie all'impiego delle sonde molecolari. Tale tipo diagnostica ha assunto rapidamente un ruolo fondamentale.

Tra i problemi tecnici affrontati con l'introduzione della biologia molecolare nella pratica clinica, i principali riguardano la standardizzazione dei metodi di analisi, la loro riproducibilità, la loro accuratezza. L'introduzione delle unità internazionali per esprimere la carica virale dell'HCV RNA, è stato un grosso passo in avanti che ha permesso di identificare uno standard di riferimento, di effettuare un confronto tra diversi standard, di poter valutare diverse metodologie di PCR tra di loro. La diagnostica biotecnologica si è rilevata di estrema importanza nella determinazione della variabilità del genoma virale che ha come principale conseguenza la generazione di mutanti di virus che sfuggono alla risposta immune e danno luogo a infezioni croniche. Il virus dell'HCV è altamente variabile; minore è la variabilità di HBV, ma mutanti non sierologicamente distinguibili si originano anche in questa infezione e possono essere identificati con l'amplificazione genomica. La variabilità del genoma di HIV, oltre a permettere al virus di evadere la sorveglianza immunitaria, si è anche rivelata un fattore determinante nello sviluppo di ceppi virali resistenti ai farmaci. Tecniche di diagnostica molecolare, che vanno dal

sequenziamento del genoma e a nuove applicazioni della PCR, si sono rivelate di grande utilità nell'evidenziare le farmacoresistenze di HIV, ai fini di instaurare una corretta terapia antiretrovirale di combinazione (HAART). Il verificarsi di sempre più frequenti episodi di infezione con *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) trova oggi saggi diagnostici biotecnologici altamente efficaci. Si è visto che dal 1,5 al 6% dei campioni risultati negativi con i tradizionali metodi di coltura, della durata di 2-4 settimane, erano positivi per PCR. Anche per questa infezione batterica l'insorgenza di mutanti resistenti ai farmaci può essere identificata in maniera relativamente semplice con l'amplificazione genomica e, di conseguenza, la tradizionale terapia con isoniazide, rifampicina e altri farmaci può essere variata in seguito al tipo di resistenza identificata.

Perché la PCR possa finalmente sostituire altre metodiche di routine nei laboratori di diagnostica microbiologica è necessaria un'automazione il più possibile completa della tecnica. C'è necessità di definire e disporre di precisi standard di riferimento, in modo da poter permettere una comparazione delle diverse metodiche utilizzate e definirne un uso appropriato nella pratica clinica. Vi è altresì necessità di definire precisi processi di standardizzazione delle procedure di analisi microbiologica, in modo da elevare l'interpretabilità del dato e qualificare la prestazione diagnostica. Le potenzialità offerte dalla disponibilità di tali tecniche diagnostiche non sempre vengono validamente considerate dal clinico, soprattutto in relazione alla loro appropriata utilizzazione nel monitorare e valutare gli esiti del trattamento. In tal senso è sicuramente necessaria una più stretta collaborazione e integrazione tra medicina clinica e di laboratorio. Nuove strategie di diagnosi e trattamento di determinate patologie dovranno in futuro essere riconsiderate.

S1.2

L'UTILIZZAZIONE NELLA PRATICA CLINICA DEGLI ESAMI MICROBIOLOGICI: PROCESSO DECISIONALE E APPROPRIATEZZA NELLA RICHIESTA

Lauria F.

Div. Malattie Infettive Ospedale S. Pio - Vasto (CH)- Az. USL 03

Introduzione

L'evoluzione delle tecnologie sanitarie ha certamente contribuito in modo determinante a promuovere la qualità dell'assistenza e a migliorare lo stato di salute della popolazione. Tuttavia, l'accelerazione tecnologica a cui abbiamo assistito in questi anni pone dei seri

problemi di valutazione, che devono essere tenuti in considerazione nell'introdurre una nuova tecnologia nella pratica clinica, valutando gli aspetti tecnici, organizzativi, di efficacia e di efficienza. Numerosi studi epidemiologici sull'utilizzazione dei servizi sanitari hanno permesso di documentare in modo sistematico l'esistenza in tutti i paesi avanzati di una significativa variabilità clinica, universale e ubiquitaria. Non sembrano esistere relazioni tra elevati livelli di utilizzazione dei servizi diagnostici ed elevata inappropriatezza ovvero, in direzione opposta, non vi è prova che a minori tassi di utilizzazione corrispondono più elevati livelli di appropriatezza. Tuttavia, almeno il 20% degli interventi sanitari utilizzati nella pratica corrente sono privi di una valida prova di efficacia; questo significa che spesso vengono utilizzate procedure, protocolli, tecniche diagnostiche, senza che siano state adeguatamente considerate e valutate.

Technology Assessment (TA) e valutazione di appropriatezza

Valutare una tecnologia sanitaria (Technology Assessment-TA) significa valutare tutto quello che viene messo in atto per la cura e per l'assistenza del paziente. Un simile processo di valutazione ha diverse dimensioni e diversi aspetti: un aspetto tecnico che riguarda l'efficacia reale e potenziale; una dimensione dell'efficienza, che riguarda l'analisi costo-beneficio, il rapporto costo-efficacia; una dimensione che riguarda le valutazioni di ordine etico, una dimensione organizzativa-manageriale. Pertanto, gli ambiti presi in considerazione da un processo di valutazione delle tecnologie sanitarie sono numerosi e riguardano fattori quali l'efficacia attesa, l'efficacia nella pratica clinica, l'utilità clinica di un test diagnostico, le sue caratteristiche tecniche e di sicurezza, la sua applicabilità, i costi e i vantaggi che ne derivano, le conseguenze derivanti dall'introduzione del test nella pratica clinica, i problemi etici, l'accettabilità del test, l'indicazione normativa, etc... Il processo di technology assessment si occupa, quindi, anche della valutazione di appropriatezza dei trattamenti e della corretta gestione del paziente.

Nell'esaminare ed analizzare la letteratura in relazione all'introduzione di un test diagnostico nella pratica clinica, è necessario verificare l'esistenza di tre requisiti fondamentali: 1) la validità dei risultati degli studi esaminati; 2) le caratteristiche di questi risultati; 3) la loro trasferibilità o utilizzo nella propria pratica clinica. Le diverse metodologie di analisi esistenti in genere fanno riferimento a due ordini di criteri: criteri primari e criteri secondari. Possono essere considerati criteri primari: valutazione di studi che presentano un confronto a doppio cieco con uno standard definito, verifica che il test è applicabile ad una appropriata gamma di soggetti. Mentre, possono essere considerati criteri secondari: la definizione di uno standard di riferimento e una metodologia del test descritta con

sufficiente dettaglio.

Il processo decisionale e la valutazione di appropriatezza

Un processo di valutazione di tecnologie sanitaria ha sempre e comunque tre aspetti, un aspetto tecnologico, un aspetto orientato ad un determinato programma o progetto e un aspetto orientato ad un problema. Un esempio può essere rappresentato dalla recente diffusione delle tecniche di biologia molecolare e del loro utilizzo nella pratica clinica, soprattutto in diagnostica microbiologica. Infatti, uno degli aspetti frequentemente affrontati da quando sono state introdotte le tecniche di biologia molecolare, ed è stato possibile determinare la cosiddetta carica virale, soprattutto per quanto riguarda i principali virus (HIV, HBV, HCV, CMV), è stato quello di capire quali vantaggi la determinazione dell'entità della carica poteva comportare sulla conoscenza della patogenesi delle infezioni e come questa informazione poteva influire sul trattamento. Per ottenere questo scopo, è stato subito evidente che un passo fondamentale era quello di definire precisi standard di riferimento, la riproducibilità, e accuratezza del metodo.

Le metodologie utilizzate per la valutazione dell'appropriatezza, sia per l'aspetto diagnostico che terapeutico, fanno riferimento quasi sempre a due criteri fondamentali: applicazione di criteri ordinari e applicazione di criteri straordinari. I criteri ordinari si applicano nel valutare l'appropriatezza della condotta di un centro clinico, di un centro diagnostico, di un singolo medico, e sono criteri standard, non modificabili, nel senso che sono consacrati dalla letteratura e dai comportamenti; sono quei criteri su cui c'è un generale accordo e consenso. I criteri straordinari scavalcano i criteri standard, sia in senso positivo sia in senso negativo, e devono essere predeterminati, specialmente quando si effettua una valutazione; si tratta di scelte su cui non vi è accordo unanime. Un esempio di criterio ordinario può essere costituito da una Consensus Conference internazionale (ad esempio, la Consensus prodotta sia dalla European Association of Study Liver sia dal NIH americana in collaborazione con l'American Association of Study Liver su come trattare i pazienti affetti da epatite C), con cui vengono fornite una serie di indicazioni su come adottare scelte terapeutiche e su come utilizzare determinati test diagnostici.

Conclusioni

La valutazione clinica di un test diagnostico comporta la risposta ad una serie di domande: perché il test è stato richiesto? , Il test è utile per il paziente? , può un test più semplice fornire informazioni equivalenti?, il test aumenta il livello di conoscenza?, si può fare a meno del test? .

I processi di valutazione delle tecnologie sanitarie così come delineati necessitano di una applicazione gradu-

le ed esistono una serie di barriere al cambiamento. Barriere che possono essere ambientali e che riguardano la pratica clinica corrente, i limiti di tempo, i limiti organizzativi, la formazione ; oppure mancanza di programmi o di risorse.

Devono essere altresì considerate una serie di difficoltà personali, quali i fattori associati con la esperienza professionale, pattern culturali e pregiudizi.

S1.4

LA VALUTAZIONE DELLE NUOVE TECNOLOGIE NELLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA

Fortina G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Az Ospedaliera Osp Maggiore della Carità, Novara

La valutazione delle nuove tecnologie non può prescindere da un primo approfondimento su cosa intendiamo per "valutazione". Questa può riguardare aspetti tecnici tradizionali come la precisione, la rapidità, la sensibilità ed altro senza tuttavia entrare nel merito di un aspetto che sarà decisivo nel futuro del laboratorio: la capacità di risolvere il quesito clinico. Le nuove tecnologie saranno valutate per la loro capacità di risolvere il dubbio all'origine della richiesta di esame di laboratorio. Questo sarà il loro vero valore aggiunto che dovranno manifestare in un Laboratorio sempre più automatizzato e che, se non troverà nella conoscenza dello specialista in microbiologia la capacità di divenire vero supporto alla risoluzione del problema clinico, si avvierà inevitabilmente a divenire un semplice esame. Conseguentemente la loro valutazione dovrà tener conto di come le stesse potranno affrontare e risolvere i possibili quesiti clinici e quali vantaggi esse potranno apportare. Infatti non è la singola metodologia che deve essere valutata, ma come le potenzialità presenti nella stessa potranno essere o saranno utilizzate.

Le nuove tecnologie hanno, in generale, potenzialità enormi che ad oggi forse non possiamo nemmeno immaginare se non con sforzi di fantasia spesso fin a se stessi. Il vero nodo è come queste saranno sfruttate. Pressione di alcune forze economiche e di alcuni indirizzi di pensiero cercheranno di sostenere l'esame che tutti, a parole, dicono di aborrire ma che ricompare regolarmente ripercorrendo iniziative della Medicina di laboratorio degli anni Settanta, quando, sotto la spinta degli analizzatori a flusso continuo gli esami non erano certo sfornati in relazione ad un percorso diagnostico. E' invece indispensabile utilizzare le potenzialità che le nuove tecnologie oggi ci offrono per costruire un percorso diagnostico adatto al singolo

paziente od alla soluzione dello specifico quesito. Questo è il supporto che le nuove tecnologie potranno offrire a noi specialisti per affermare con forza il nostro ruolo professionale, nonostante la rivoluzione robotica e tecnologica che coinvolgerà inevitabilmente il Laboratorio in tutti i suoi settori. A seconda di come sapremo indirizzare le potenzialità di queste nuove tecnologie evolverà anche la Medicina di Laboratorio ed il Laboratorio del futuro.

S1.5

LA MODERNA GESTIONE DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA CLINICA

Marchetti D.

Laboratorio Microbiologia- Ospedale Bellaria- Bologna

I grandi cambiamenti occorsi negli ultimi anni nelle tecnologie applicate al Laboratorio nella sua integrità ed in particolare alla Microbiologia devono far riflettere sul nuovo assetto e su nuove problematiche di management, con un confronto costante anche con la rapida evoluzione della politica sanitaria locale, nazionale e sovranazionale.

In questo nuovo contesto l'organizzazione del laboratorio di Microbiologia deve tener conto di concetti di management nel suo insieme, della ottimizzazione dell'uso delle risorse economiche assegnate, delle attività di laboratorio che si vogliono implementare o per le quali esista una particolare attenzione, della qualità del servizio intesa non solo come insieme di procedure e norme cui riferirsi, ma anche come esempio di efficienza ed efficacia delle prestazioni da effettuarsi in una ottica di miglioramento continuo.

Per quanto attiene l'organizzazione del laboratorio grande attenzione va sempre posta al migliore utilizzo delle risorse umane presenti, alla loro incentivazione attraverso il coinvolgimento professionale e personale nei progetti che si vogliono portare avanti e nei goals che si vogliono raggiungere attraverso l'implementazione e il controllo dei processi.

Il management dell'assetto organizzativo deve comportare nuove realtà organizzative di tipo trasversale; il coinvolgimento del personale nella gestione quotidiana dei processi produttivi e delle migliori opportunità di soddisfare i bisogni del cliente /utente può indirizzare ad una gestione più efficiente della organizzazione.

Questa nuova organizzazione risente anche della transizione da una economia di mercato, non competitiva, ad una maggiore competitività di tutto l'assetto del servizio. Se si identifica nel management la gestione di tutte le complessità organizzative, esistono diversi

aspetti di cui tenere conto nell'organizzazione di un laboratorio di Microbiologia.

L'organizzazione non deve prescindere dall'attenta identificazione degli obiettivi che devono essere chiari, commissionati alle risorse umane ed economiche disponibili e debbono soddisfare i bisogni del cliente; occorre definire criteri di priorità strategica basati sulle risorse disponibili, sulla forza e sulle debolezze della organizzazione, sulle opportunità all'esterno e sulla chiara definizione di obiettivi a breve, medio e lungo termine: occorrerà sempre tenere in considerazione la realtà sanitaria nella quale il servizio si trova ad operare.

Altro aspetto importante dell'organizzazione riguarda l'identificazione delle problematiche specifiche proprie delle fasi preanalitica, analitica e postanalitica.

Ogni laboratorio deve descrivere con chiarezza la tipologia delle prestazioni effettuate e per le stesse deve descrivere le modalità di raccolta, conservazione e trasporto dei campioni, deve poter vigilare sull'appropriatezza delle richieste pervenute, deve esplicitare i tempi di refertazione di ogni prestazione, fornendo così al cliente/utente sia esso paziente o clinico o istituzione esterna ogni possibile informazione ed assistenza sulla attività prestata dal servizio.

Nell'ambito della gestione quotidiana dell'attività, in una ottica di miglioramento continuo della qualità, sia essa svolta per un processo di accreditamento o di certificazione, obiettivo imprescindibile sarà la standardizzazione delle procedure utilizzate per il raggiungimento del prodotto finale.

La gestione del personale è uno dei nodi cruciali dell'organizzazione; il costo del lavoro rappresenta una voce preponderante nell'esercizio dell'organizzazione. Il livello di produttività dell'equipe va commisurata ad una organizzazione del lavoro che tenga conto dell'utilizzo della professionalità precipua di ogni persona dal tecnico di laboratorio che ha ormai acquisito notevoli capacità professionali in questo settore, al laureato il cui vero compito è quello legato alla gestione del lavoro del settore, alla supervisione dell'operato tecnico, alla refertazione il più rapida possibile di quanto processato, al necessario aggiornamento o addestramento del personale affidato, al dialogo con i clienti, specie con i colleghi clinici per la scelta dei percorsi più opportuni da seguire nel processo diagnostico in una ottica di più elevata efficacia/efficienza delle risorse utilizzate.

Il tipo di professionalità disponibili, l'attribuzione delle funzioni ad ogni professionista, il coinvolgimento del personale nel processo produttivo rappresentano tappe importanti di cui tenere conto in questo percorso.

Per quanto attiene alle strumentazioni la loro scelta va fatta tenendo conto del carico di lavoro, della sua distribuzione, del grado di automazione che si intende perseguire e dell'eventuale eccesso di capacità delle stesse strumentazioni rispetto ai fabbisogni locali,

eccessi che possono essere assorbiti da una pianificazione accurata del lavoro.

In futuro le tecniche di biologia molecolare e l'utilizzazione di nuove metodiche di amplificazione come la PCR real time permetteranno di poter identificare in tempi rapidi sia gli agenti eziologici che i pattern di resistenza di infezioni virali, parassitarie e batteriche.

La gestione dei costi avviene oggi attraverso la predisposizione e la discussione del budget, le previsioni di spesa, la gestione degli acquisti ed il controllo della spesa; tutte queste funzioni rappresentano attività ormai condivise non solo dai dirigenti del settore, ma anche da coloro che, in pratica, gestiscono la quotidianità del servizio.

In conclusione nella moderna gestione del laboratorio di microbiologia occorre tener conto di molteplici aspetti dei quali i più importanti riguardano la stesura di un programma di attività in grado di soddisfare le esigenze ed i bisogni dei clienti, la gestione accurata delle risorse umane affidate e ultimo, ma non meno importante, la gestione e razionalizzazione dei costi in una ottica di moderna gestione di un servizio spesso articolato in una realtà locale multiforme.

relazioni

SESSIONE 2

Tipizzazione Batterica

Mercoledì 15 ottobre 2003, 9.00-13.00 Sala Giotto
Palazzo Affari - 3° piano

S2.2

ANALISI E VALIDAZIONE DEI RISULTATI NELLE INDAGINI DI EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE

Carretto E., Barbarini D., Marone P.

*Laboratori Sperimentali di Ricerca, Area Infettivologica,
IRCCS Policlinico "San Matteo", Pavia*

Un nuovo impulso alla tipizzazione microbica si è avuto con l'estesa applicazione in questo ambito delle tecniche di biologia molecolare. Variabili nella tipologia, nessuna di esse ha caratteristiche di universalità (cioè funziona bene per la totalità delle specie microbiche), e la maggior parte non è sufficientemente standardizzata. L'utilizzo di una tecnica molecolare a fini di tipizzazione non può prescindere dall'adeguata conoscenza dei suoi criteri interpretativi, variabili a seconda delle metodiche. Linee guida sono state proposte, ad esempio, per l'interpretazione di patterns ottenuti con la PFGE, con la ribotipizzazione e con l'amplificazione con primers arbitrari (RAPD). Nel caso della PFGE si sono correlate le variazioni geniche di singoli isolati con il numero di bande risultanti, proponendo quindi la definizione dei ceppi come clonali, strettamente correlati, possibilmente correlati e non correlati: ceppi sicuramente non correlati devono possedere almeno sette bande di differenza nei loro profili. Nel caso della ribotipizzazione due profili sono invece considerati appartenere a cloni distinti quando differiscono per almeno una banda netta. E' più difficile fornire criteri interpretativi per profili ottenuti con i RAPD: tentativi di standardizzazione per analisi eseguite con primers conservati (ERIC1 e ERIC2) sembrano indicare una non clonalità per profili che differiscono per almeno tre bande, ma è intrinseca al metodo la possibilità di utilizzare primers scelti a caso e, inoltre, con questa metodica è frequente il riscontro di

bande di intensità differente di difficile interpretazione. Dagli esempi è evidente come ogni tecnica abbia criteri interpretativi sostanzialmente differenti. Un ausilio può essere fornito dall'utilizzo di software dedicati all'analisi e all'interpretazione dei dati, ma in ogni caso i risultati proposti devono sempre essere validati dall'esperienza dell'operatore. Infine, qualora eseguano indagini per valutare sospetti outbreak nosocomiali, i dati ottenuti con tecniche molecolari devono essere sempre integrati e verificati con il dato clinico-epidemiologico. Senza quest'ultimo, l'universo dell'epidemiologia molecolare rischia di essere un "universo parallelo" dal quale è difficile desumere alcun tipo di informazione.

S2.3

IMPORTANZA DELLA TIPIZZAZIONE BATTERICA NELLO STUDIO DELLE INFEZIONI NOSOCOMIALI

Fossati L., Ravotto M.

SC Microbiologia, AO San Giovanni Battista Torino

Le infezioni nosocomiali insorgono durante la degenza in ospedale, non sono clinicamente presenti né in incubazione al momento del ricovero e alcune possono manifestarsi anche dopo la dimissione (ad es., in particolare le infezioni della ferita chirurgica).

I batteri Gram negativi rappresentano i patogeni maggiormente rappresentati, anche se negli ultimi anni è aumentato il riscontro di batteri Gram positivi (stafilococchi, enterococchi) e di miceti (Candida).

In caso di aumento della frequenza di isolamento di potenziali patogeni in una data area dell'ospedale accompagnata dal riscontro di nuovi casi di infezione, è necessario avviare un'indagine epidemiologica per identificare le cause dell'epidemia e individuare i punti

critici della catena di trasmissione: contatto diretto, da soggetto infetto ad un altro non infetto o attraverso droplets; contatto indiretto, attraverso le mani del personale e/o da veicoli quali sangue, liquidi d'infusione, farmaci, disinfettanti, e tutte le altre modalità di trasmissione da fomite ambientali (aspergilloso, legionellosi).

Nell'ambito dell'indagine epidemiologica, deve essere costituito un gruppo di lavoro ad hoc che svolge una sorveglianza diretta nel reparto, basata sulla raccolta sistematica dei dati relativi ai casi di infezione e sulla revisione delle procedure assistenziali. E' indispensabile infine, sulla scorta dei dati epidemiologici, procedere alla tipizzazione dei microrganismi coinvolti per valutare se l'eventuale epidemia riconosce una origine comune ambientale o se è da attribuire a trasmissione interumana, in cui il paziente stesso colonizzato o infetto funge da serbatoio dell'infezione. Le tecniche di tipizzazione molecolare permettono di stabilire l'identità o la correlazione clonale di ceppi batterici, di ricercare il pattern di trasmissione dei cloni e gli eventuali serbatoi, e inoltre di stabilire la potenziale efficacia delle misure di controllo adottate. Negli ultimi anni lo sviluppo di metodiche molecolari basate sullo studio del polimorfismo genetico ha fornito un notevole contributo allo studio epidemiologico delle infezioni. Tali tecniche devono soddisfare determinate caratteristiche quali la riproducibilità, la stabilità, il potere discriminatorio, la concordanza epidemiologica, la rapidità di esecuzione e la facilità di interpretazione dei risultati. Tra i metodi di confronto più utilizzati vi sono quelli che si basano sull'analisi dei polimorfismi di restrizione del genoma batterico sia mediante PFGE, sia mediante Southern blot. Quest'ultimo risulta essere moderatamente discriminante, ma molto riproducibile e stabile.

L'analisi elettroforetica dei pattern di restrizione mediante PFGE rappresenta il gold standard per la tipizzazione di molti microrganismi patogeni. Questa tecnica risulta avere un elevato potere discriminatorio, ma prevede tempi di esecuzione maggiori rispetto ad altre analisi. La versatilità e la sensibilità della metodica nel rilevare riarrangiamenti genomici minimi permette di interpretare correttamente gli episodi epidemici e di essere utilizzata negli studi di sorveglianza: un profilo identico permette di ipotizzare la clonalità del ceppo mentre problemi di interpretazione si possono avere in caso di profili simili ma non identici.

La ribotipizzazione mediante utilizzo di strumenti completamente automatizzati (Riboprinter) presenta caratteristiche di alta riproducibilità, stabilità e un discreto potere discriminatorio, poichè gli operoni ribosomali rappresentano solo lo 0.1% dell'intero cromosoma batterico. Altre tecniche di tipizzazione (RAPD) prevedono l'amplificazione di sequenze arbitrarie con l'utilizzo di primers non specifici e condizioni di bassa stringenza.

Nel nostro laboratorio viene effettuata una sorveglianza

quotidiana nei confronti dei principali microrganismi sentinella (MRSA, VRE, P.aeruginosa MDR, enterobatteri produttori di ESBL, C. difficile, Legionella, Aspergillus e altri): in caso di rilevazione di un cluster epidemico, vengono tipizzati i microrganismi coinvolti mediante le tecniche della PFGE (VRE e MRSA), Riboprinter (P.aeruginosa, Enterobacteriacee e S.maltophilia) e RAPD (MRSA).

S2.4

LA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE COME RAFFORZAMENTO DELLA SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI DA SALMONELLA - IL PROGETTO EUROPEO SALMGENE

Luzzi I., Filetici E., Dionisi AM., Scalfaro C.

Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299 Roma

Nei Paesi industrializzati Salmonella è un patogeno zoonotico che riconosce nel pollame, nei bovini e nei suini il principale serbatoio animale e negli alimenti di origine animale i principali veicoli di trasmissione all'uomo. Il commercio internazionale di animali e alimenti, ampiamente diffuso in Europa, rende possibile la comparsa di episodi epidemici a livello internazionale.

La prevenzione e il controllo delle salmonellosi dipende in larga misura da un valido sistema di sorveglianza basato sulla tipizzazione degli isolati batterici. I metodi universalmente accettati per la tipizzazione delle salmonelle sono rappresentati dalla sierotipizzazione e dalla fagotipizzazione in grado di discriminare all'interno dei sierotipi. Il valore di questi metodi fenotipici come strumento di sorveglianza è ben stabilito anche se, a causa della predominanza di alcuni sierotipi e fagotipi in molti Paesi, tecniche molecolari basate sul DNA devono essere utilizzate nelle investigazioni degli episodi epidemici quando è necessario aumentare la discriminazione tra i ceppi.

Tra i metodi molecolari l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) rappresenta il gold standard: è altamente discriminante e capace di suddividere gli isolati batterici correlati a situazioni epidemiche.

In Europa da anni è attivo in Europa un sistema di sorveglianza delle infezioni da Salmonella (Enternet)) e nel 2002 è stato avviato un progetto finanziato dalla Comunità europea con l'obiettivo di valutare il valore aggiunto di una tipizzazione molecolare per il riconoscimento degli episodi epidemici. Il progetto, a cui partecipano 10 paesi europei tra cui l'Italia, ha come obiettivi primari quelli: i) di sviluppare procedure operative standard per l'esecuzione della PFGE e per il riconoscimento computerizzato dei risultati, ii) di crea-

re un archivio consultabile di profili elettroforetici dei principali sierotipi di *Salmonella* circolanti in Europa, iii) di tipizzare in tempo reale un gran numero di ceppi in ciascun Paese usando criteri di selezione che rendano massimo il potere di rilevazione degli episodi epidemici, iv) di analizzare continuamente i dati nell'archivio on line, infine v) di stabilire un controllo di qualità esterno per la PFGE.

I profili elettroforetici di circa 10000 ceppi di *Salmonella* responsabili di infezioni umane, appartenenti a diversi sierotipi e isolati in anni diversi, sono stati ottenuti nei diversi centri partecipanti al progetto ed inviati al centro di coordinamento presso l'HPA di Colindale, dove sono stati elaborati mediante un software dedicato (Bionumerics) ed inseriti in un archivio elettronico. I risultati finora ottenuti hanno permesso di classificare 1500 ceppi di *S. enteritidis* in 29 profili elettroforetici e 1300 ceppi di *S. typhimurium* in oltre 60 profili. L'analisi ha consentito inoltre di valutare la capacità discriminante della PFGE all'interno dei diversi tipi fagici e la distribuzione dei profili elettroforetici per area geografica.

I controlli di qualità esterni (che hanno luogo ogni 6 mesi) hanno mostrato che è possibile riprodurre i risultati a livello dei diversi centri partecipanti e di trasferire elettronicamente le informazioni ad un archivio centrale.

Per la tipizzazione in tempo reale, ceppi di recente isolamento e appartenenti ai sierotipi e fagotipi prevalenti, vengono tipizzati mediante PFGE nei diversi centri europei ed inviati settimanalmente insieme alle informazioni epidemiologiche al centro di coordinamento che provvede alla gestione del database europeo.

Il confronto dei profili elettroforetici di ceppi responsabili di focolai epidemici di salmonellosi nei diversi Paesi della UE, insieme ad altri dati di tipizzazione e alle informazioni epidemiologiche fornirà una solida base per l'introduzione di appropriate strategie di intervento.

S2.5

PNEUMOCOCCO MULTIRESISTENTE: LA TIPIZZAZIONE GENOTIPICA COME METODO TRACCIANTE I PRINCIPALI CLONI

Dicuonzo G., Pantosti A.

Università Campus Biomedico e Istituto Superiore di Sanità, Roma

Dalla fine degli anni 80 sono comparsi e si sono rapidamente diffusi ceppi di pneumococco che presentano resistenza alla penicillina e ad altri antibiotici, soprattutto ai macrolidi. La resistenza in pneumococco è generalmente dovuta a trasmissione orizzontale di

materiale genetico, per trasformazione o per coniugazione, mediante trasposoni coniugativi. Un ceppo resistente possiede caratteristiche vantaggiose per la sopravvivenza, per cui può essere selezionato positivamente nell'ambiente in cui si trova, e la sua progenie può espandersi dando origine ad un clone. Una caratteristica importante dei cloni multiresistenti è che la selezione può essere effettuata da uno solo degli antibiotici ai quali è resistente. Il riconoscimento dei cloni, delle loro caratteristiche e della loro diffusione è quindi estremamente importante per comprendere le dinamiche dell'antibiotico-resistenza in una determinata popolazione o area geografica. La tipizzazione fenotipica mediante il sierotipo capsulare rappresenta il dato di base per la descrizione di un clone; la sua utilità però è limitata in quanto uno stesso sierotipo può comprendere diversi cloni, e nell'ambito di un clone possono avvenire cambiamenti ("switch") capsulari. La tipizzazione genotipica, invece, basata su caratteristiche dell'intero genoma o sulla sequenza di geni particolari, è in grado di fornire in maniera univoca una "impronta digitale" del ceppo. Per il pneumococco il "gold standard" è rappresentato dai profili di macrorestrizione del DNA ottenuti mediante elettroforesi in campo pulsato, mediante i quali si ottiene un'ottima discriminazione tra i ceppi ed il confronto è relativamente facile. Recentemente è stata sviluppata una metodica basata sulle sequenze di 7 geni che codificano per alleli di enzimi metabolici denominata Multilocus Sequence Type (MLST). Grazie ad un programma accessibile in Internet (<http://spneumoniae.mlst.net>), è possibile attribuire un numero a ciascuna sequenza allelica di ciascun gene. Il profilo allelico del ceppo determina il sequence type (ST) e può essere confrontato con quello di ceppi isolati in diverse parti del mondo presenti nella banca dati del sito. Ad oggi vi sono più di 800 ST ottenuti dai ceppi esaminati. Sempre utilizzando gli strumenti del sito, è possibile costruire un albero filogenetico che tiene conto delle distanze tra i vari ceppi e suggerisce rapporti clonali ed evoluzione di cloni. Applicando questi metodi abbiamo studiato ceppi di pneumococco provenienti da malattie invasive isolati in varie aree geografiche italiane. Abbiamo accertato che nel nostro paese sono presenti ceppi appartenenti a cloni internazionali antibiotico-resistenti, che sono diffusi in molti paesi europei quale il clone penicillino-resistente France/Spain^{9V}-3, il clone penicillino-sensibile eritromicino-resistente England¹⁴-9, e un clone di sierotipo 6B penicillino-sensibile ma multiresistente diffuso in diversi paesi dell'area mediterranea. Abbiamo anche individuato nel nostro paese un clone originariamente apparso in Svezia come penicillino-sensibile e come sierotipo 15A (il clone Sweden^{15A}-25), che nel nostro paese è presente con ceppi intermedi alla penicillina e appartenenti sia al sierotipo 15A che con switch capsulare al sierotipo 19A. Infine, abbiamo individuato un clone nuovo, che non era stato descritto in precedenza, multiresistente ed appartenente ad un

sierotipo poco comune, il sierotipo 24F, responsabile di casi di meningite a Napoli.

S2.6

LA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE NELLE INFEZIONI DA MICOBATTERI TUBERCOLARI

Cirillo D.M.

SC Microbiologia, AO San Giovanni Battista - Torino

La tubercolosi costituisce un importante problema di salute pubblica in tutto il mondo, non solo nei paesi in via di sviluppo ove i tassi di incidenza sono epidemici, ma anche nei paesi industrializzati, soprattutto in popolazioni a rischio come i soggetti immunocompromessi e gli immigrati. L'epidemiologia molecolare rappresenta un nuovo ed irrinunciabile strumento nella lotta alla malattia tubercolare. La genotipizzazione degli isolati di *M. tuberculosis* permette di delineare il percorso interumano con importanti ricadute in termini di sorveglianza della dinamica diffusiva della malattia. Dal punto di vista metodologico l'analisi dei polimorfismi di restrizione della sequenza *IS6110* (RFLP-*IS6110*) rappresenta la metodica di riferimento per la tipizzazione degli isolati di *M. tuberculosis*. Tale tecnica, per la sua complessità permette un'analisi dei dati con mesi di ritardo dalla raccolta del campione. Tecnica alternativa per quei ceppi con poche sequenze inserzionali *IS6110* è l'elettroforesi in campo pulsato dopo digestione del genoma con enzimi di restrizione. Anch'essa richiede la crescita di micobatteri tubercolari in alte quantità. Pertanto uno degli orientamenti attuali è rappresentato dalla valutazione di metodiche in amplificazione, più rapide ed applicabili anche a minime quantità di DNA. A tale scopo sono state proposte tecniche che utilizzano come target le sequenze inserzionali *IS6110* (LM-PCR, mixed-linker PCR) o sequenze differenti (spoligotyping). Il potere discriminatorio di tali metodiche si è rivelato però inferiore all'RFLP-*IS6110*, che resta a tutt'oggi il "gold standard" per la genotipizzazione di *M. tuberculosis*. La Haeminested Inverse PCR (HIP), basata sulla amplificazione di sequenze che fiancheggiano l'*IS6110* e la VNTR-MIRU che si basa sui variable number tandem repeats (VNTR) di elementi definiti mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) si sono dimostrate promettenti sia per il potere discriminatorio sia per la semplicità di esecuzione. Un secondo aspetto applicativo delle metodiche di genotipizzazione rapida potrebbe essere rappresentato dalla possibilità di operare direttamente sul campione clinico, fornendo in tempo pressoché reale notizie importanti dal punto di vista clinico ed epidemiologico. Sino ad ora esistono studi in letteratura riguardanti solamente lo spoligoty-

ping, che presenta però il limite di essere una metodica relativamente poco discriminante e quindi di limitata utilità. Sicuramente la messa a punto e la validazione di protocolli operativi riguardanti in questo ambito altre metodiche rapide potrebbe rappresentare un netto salto di qualità metodologico degli studi di epidemiologia.

S2.7

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI *BACILLUS ANTHRACIS*

Carattoli A.¹, Oggioni M.R.²

¹ Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità-Roma;

² Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena - Siena

In accordo con le linee guida internazionali (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) e nazionali (Istituto Superiore di Sanità, ISS), la diagnosi microbiologica di *Bacillus anthracis* è organizzata in livelli progressivi di accertamento e conferma. Nel caso di sospetto isolamento di *B. anthracis*, il ceppo viene analizzato per la conferma definitiva da un laboratorio di riferimento nazionale. Durante l'attacco bioterroristico negli USA, in Italia sono state elaborate linee guida per il potenziamento diagnostico di agenti patogeni potenzialmente utilizzabili a scopo bioterroristico ed è stata creata una rete di laboratori di riferimento in grado di fornire una diagnosi definitiva ed eventualmente una tipizzazione molecolare dei ceppi isolati. In questo ambito, il gruppo di lavoro sul bioterrorismo ISS in collaborazione con l'Università di Siena ha messo a punto metodi molecolari basati sull'amplificazione per PCR ed ibridazione con sonde specifiche (Real-time PCR) per il riconoscimento e la caratterizzazione di *B. anthracis*. In particolare, è stato messo a punto un protocollo diagnostico basato sulla rilevazione diretta di spore di *B. anthracis* nei tamponi nasali, mediante arricchimento in brodo, sterilizzazione in autoclave e rilevazione di geni specifici per Real-time PCR. Sono state disegnate due coppie di primer utili all'identificazione definitiva di *B. anthracis*: una sul gene *lef* del plasmide pX01 ed una sul gene cromosomale *rpoB*. Inoltre, una sonda disegnata sul gene *lef* (*lefC* probe) permette di distinguere il ceppo Sterne (ceppo vaccinale veterinario), usato nel nostro protocollo come controllo positivo dai ceppi selvatici isolati in Italia e dal ceppo Florida isolato negli USA dal primo caso di antrace polmonare nel 2001. La sonda disegnata sul gene *rpoB* distingue il *B. anthracis* da altre specie del genere *Bacillus*, compreso il *B. cereus*. Per la tipizzazione dei ceppi di *B. anthracis* sono state messe a punto tecniche di amplificazione e sequenzia-

mento del DNA per la rilevazione di loci polimorfici nei geni *vrpA* e *vrpB*. Mediante questa analisi sono state individuate le varianti genetiche che caratterizzano alcuni ceppi isolati in Italia dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali delle Venezie e del Lazio e Toscana da animali e dall'uomo. Questo tipo di analisi è riconosciuta a livello internazionale ed è utilizzabile in caso di attacco bioterroristico come indagine per la ricerca della sorgente di infezione e per la comparazione di ceppi isolati dai casi clinici e dall'ambiente.

relazioni

SESSIONE 3

Infezioni nosocomiali e controlli ambientali

Giovedì 16 ottobre 2003, 9.00 - 13.00 Sala Leonardo Palazzo Affari - piano - I
Sala Galileo Palazzo Affari - 2° piano

S3.2

I CAMPIONAMENTI AMBIENTALI: COME FARLI

Pasquarella C.

*Dipartimento di Sanità Pubblica -
Università degli Studi di Parma*

I campionamenti ambientali, nella valutazione quantitativa e/o qualitativa della contaminazione microbica di aria, acqua e superfici, diventano uno strumento utile nella prevenzione del biorischio, se effettuati in maniera appropriata.

Mentre per il campionamento microbiologico dell'acqua sono ben definite le procedure da seguire, per quanto riguarda l'aria e le superfici non sono disponibili protocolli standardizzati generalmente validi e comunemente applicati, relativi sia al metodo di campionamento che alla interpretazione dei risultati.

Per il campionamento delle particelle biologiche aerodisperse possono essere utilizzati un metodo attivo o un metodo passivo. Il campionamento attivo si basa sull'aspirazione di un volume noto di aria che viene proiettata con forza contro una superficie di raccolta che può essere solida o liquida, utilizzando diverse tecniche (ad impatto su substrato solido, ad impatto su substrato liquido, per filtrazione). I diversi campionatori presentano una diversa efficienza fisica e biologica collegate all'ingegneristica dell'apparecchio utilizzato e alla sopravvivenza all'impatto dei microrganismi, fattori che, insieme alla mancanza di protocolli standard di riferimento, sono responsabili dell'ampia variabilità dei risultati ottenuti, rendendo molto difficile la scelta del campionatore, il confronto dei risultati e la verifica del rispetto di valori soglia di contaminazione, laddove definiti. Il campionamento passivo si basa sull'utilizzo di piastre Petri contenenti un terreno nutriente, lasciate esposte per un dato periodo di

tempo. Tale campionamento non è un campionamento volumetrico, cioè non fornisce una valutazione quantitativa dei microrganismi presenti in un determinato volume d'aria, ma dà indicazioni sul fall-out microbico, cioè su quella parte di bioaerosol che si deposita su una superficie critica e che quindi può rappresentare un pericolo. Il campionamento passivo diventa il metodo di scelta laddove è importante avere informazioni sulla quantità di microrganismi che sedimentano, ad esempio in sala operatoria, come stima dei microrganismi che si andranno a depositare sulla ferita chirurgica durante un'intervento, mentre non è raccomandabile se oggetto di interesse sono i microrganismi sospesi nell'aria. Le piastre hanno il vantaggio, sfruttando semplicemente la forza di gravità, di mantenere integra la vitalità dei microrganismi raccolti. Il metodo è stato standardizzato con la definizione dell'IMA (Indice Microbico Aria) - che corrisponde al numero di unità formanti colonia che si depositano su una piastra Petri di 9 cm di diametro, lasciata aperta per un'ora, ad un metro da terra, ad un metro da ogni ostacolo fisico rilevante - e con la definizione di valori per la interpretazione dei risultati. Un metodo utilizzato per valutare l'efficienza

Tra i metodi di campionamento disponibili per la valutazione della carica microbica delle superfici (tampone, spugne, lavaggio, piastre RODAC, membrane di nitrocellulosa) sono da preferirsi, in particolare per la valutazione quantitativa, le tecniche standardizzate come le piastre RODAC e le membrane di nitrocellulosa. Queste ultime hanno il vantaggio di essere chimicamente inerti, di essere flessibili, adatte quindi anche a superfici curve, e di permettere la lettura anche di un elevato numero di colonie.

Sia per il campionamento dell'aria che dell'acqua e delle superfici è indispensabile definire i punti di campionamento e il numero dei campioni, prestare attenzione al trasporto e alla conservazione dei campioni che non possono essere processati immediatamente e avere a disposizione un laboratorio di supporto, indispensabile per una analisi accurata dei campioni, in

accordo con l'obiettivo (quantificazione, identificazione e/o tipizzazione). Il campionamento ambientale, infatti, non è una semplice raccolta di dati ma costituisce uno strumento per raccogliere informazioni finalizzate alla comprensione di un fenomeno, al fine di prendere decisioni e avviare interventi. Per tale motivo elementi collegati ad un appropriato utilizzo della pratica del campionamento ambientale sono la definizione degli obiettivi; la pianificazione; l'accuratezza sotto il profilo scientifico; la corretta analisi e interpretazione dei dati; la comunicazione efficace dei risultati e l'avvio degli opportuni interventi correttivi, in caso di situazioni anomale.

S3.3

RISCHIO DI ASPERGILLOSI IN OSPEDALE

Viale P., Cristini F.

*Clinica di Malattie Infettive -
Policlinico Universitario di Udine*

Aspergillus spp. è un fungo filamentoso implicato in molti aspetti di patologia umana; tra le specie note *A. fumigatus* è nettamente prevalente, sebbene *A. flavus*, *niger*, *terreus* e più raramente altri, siano ripetutamente e sempre più frequentemente descritti come agenti causali di malattia.

Le patologie indotte da *Aspergillus* spp. comprendono una varietà di manifestazioni cliniche raggruppabili fondamentalmente in tre categorie: colonizzazione di cavità pre-esistenti (Aspergilloma), patologie atopiche (Aspergillosi bronco-polmonare allergica) e malattia invasiva (Aspergillosi Invasiva).

Quest'ultima entità clinica rappresenta un evento di notevole impatto per gravità e prognosi, con incidenza particolarmente rilevante in pazienti portatori di gravi condizioni di deficit immunologico quali neutropenici gravi, trapiantati di organo solido, trapiantati di midollo osseo con o senza GVHD, soggetti in terapia steroidea cronica, malati di AIDS e portatori di patologie granulomatose croniche. Sono altresì descritti in letteratura casi sporadici occorrenti in pazienti con minor grado di immunodepressione.

L'Aspergillosi Invasiva è caratterizzata da una prognosi molto severa, con mortalità complessiva stimata superiore a 50%. Il tasso di mortalità è intorno a 30% nelle forme polmonari localizzate, ma arriva a 60% nelle forme diffuse e supera il 90% nelle localizzazioni al Sistema Nervoso Centrale.

L'entità di tale problematica clinica impone oltre ad un corretto approccio clinico-gestionale, anche un importante sforzo di prevenzione in ambito ospedaliero, quest'ultimo particolarmente impegnativo in rapporto alle caratteristiche epidemiologiche del patogeno; la sua

condizione di microrganismo ubiquitario (normalmente presente nel terreno, sulle piante, nei detriti vegetali e dell'edilizia) rende la contaminazione "indoor" nosocomiale (dell'aria e degli oggetti inanimati) un evento altamente frequente e difficilmente evitabile in assenza di opportuni interventi.

Un approccio razionale alla problematica della prevenzione delle infezioni aspergillari in ospedale implica la conoscenza delle variabili di rischio su cui incidere per instaurare una politica di prevenzione efficace e cost-effective. Tali variabili sono fondamentalmente inquadrabili all'interno di due categorie, i fattori legati all'ospite ed i fattori ambientali. Mentre i primi, precedentemente citati, sono per loro natura ineliminabili, e minimamente governabili dalla profilassi antimicrobica, i secondi possono e devono essere oggetto di controllo. Tra questi ultimi meritano particolare menzione la contaminazione degli impianti di aerazione e condizionamento dell'aria, i lavori di edilizia (soprattutto ristrutturazioni e smantellamenti nelle vicinanze o addirittura all'interno dei reparti a rischio), l'efficacia dei sistemi attivi di controllo della qualità dell'aria negli ambienti ospedalieri. E' proprio a tale livello che la prevenzione assicura risultati tangibili, attraverso interventi mirati ad abbattere la concentrazione di particolato ambientale e la contaminazione da spore aspergillari; tale obiettivo è raggiungibile attraverso la progettazione o l'adeguamento di reparti e stanze di degenza, al fine di garantire caratteristiche strutturali "protettive" e dispositivi attivi di controllo della qualità dell'aria: stanze a pressione positiva, impianti di aerazione che assicurino ricambi d'aria efficaci, stanze con flusso d'aria laminare ed installazione di filtri HEPA sono approcci di efficacia documentata ed adottati dalle più moderne strutture di degenza per malati immunocompromessi.

Nella letteratura scientifica sono stati documentati numerosi *outbreaks* di aspergillosi correlabili alla qualità dell'ambiente ospedaliero occorrenti sia in pazienti tipicamente a rischio per infezioni opportunistiche che in pazienti non immunodepressi ma sottoposti a procedure diagnostiche e terapeutiche invasive. Le stesse esperienze, talora drammatiche per entità dell'evento e per gravità clinica dello stesso, dimostrano come un attento e razionale controllo ambientale concorra al contenimento dell'emergenza epidemiologica correlata ad *Aspergillus* spp.

S3.4

RISCHIO DI LEGIONELLOSI IN OSPEDALE

Ruggenini Moiraghi A.

Già Professore Ordinario di Igiene -
Dipartimento di Sanità Pubblica - Università di Torino
Presidente Società Italiana di Igiene -
sez Piemonte - Valle d'Aosta

L'infezione da *Legionella* nella sua manifestazione più grave si esprime clinicamente con una forma di polmonite segmentaria o lobare, spesso complicata (complicazioni cardiache, neurologiche, renali).

La classificazione della polmonite come "nosocomiale" si basa sull'insorgenza compatibile con il periodo di incubazione (2-10 giorni) e sulla corrispondenza ad una precisa definizione di caso.

La valutazione del rischio di contrarre una legionellosi nosocomiale va impostata sull'analisi dei tre parametri costituenti il triangolo epidemiologico proprio di ogni malattia infettiva (agente, ospite, ambiente).

- 1) **Agente:** batteri Gram negativi, di forma bastoncellare, prevalentemente mobili appartenenti alla famiglia *Legionellaceae*, genere *Legionella*: Sono attualmente note 52 specie, di alcune delle quali sono stati identificati diversi sierogruppi (14 per la sola specie *L. Pneumophila*, la più nota, in quanto ritenuta responsabile del 90-98% dei casi). In particolare il sierogruppo 1 è stato implicato nel determinismo di circa 80% dei casi individuati. Non è ancora definita la dose minima infettante.
- 1) **Ospite:** una notevole quota della popolazione ricoverata in ospedale presenta fattori noti per favorire il rischio di infezione (età avanzata, broncopneumopatie ostruttive, tabagismo, etilismo, diminuzione delle difese immunitarie a causa di patologie o di interventi terapeutici, neoplasie, grave insufficienza renale, diabete, ventilazione meccanica). Alcuni pazienti costituiscono inoltre un gruppo ad altissimo rischio (immunodepressi gravi, in particolare trapiantati e immunodepressi a seguito di corticoterapia prolungata (0,5 mg/kg di prednisone per 30 o più giorni) o ad alte dosi (5 mg/kg per 5 giorni o più). Oltre allo stato immunitario modificano la probabilità di acquisire l'infezione l'entità e la durata dell'esposizione ai microaerosol contaminati derivanti dagli impianti idrici e dagli apparati di condizionamento dell'aria inquinati o dal pulviscolo smosso e trasportato dall'aria, derivante da opere di scavo.
- 3) **Ambiente:** *L. pneumophila* vive e si concentra in ambiente umido, favorita anche dalla presenza di altri componenti la microflora degli impianti (idrici, di nebulizzazione, di umidificazione o di raf-

freddamento), quali protozoi acquatici (*Acanthameba* e *Naegleria*), nel cui interno le legionelle possono replicarsi, fino a liberarsi nell'ambiente, a causa della rottura delle membrane. Altri fattori e sostanze, anche se non tutti ben definiti, possono favorire lo sviluppo di legionelle: la temperatura (ottimale 35-45° C), il ristagno, la formazione di sedimenti e la presenza di sostanze biodegradabili, la gomma, l'acciaio inossidabile, il silicone.

Pertanto, in occasione del verificarsi di casi ci si debbono proporre alcune domande: E' identificato o identificabile un serbatoio? Tale serbatoio giustifica l'esistenza di endemia o di epidemia di legionellosi? I ceppi eventualmente isolati dall'ambiente sono identici a quelli osservati nei malati? L'eliminazione del serbatoio è possibile e durevole nel tempo ed ha impatto favorevole, documentabile sull'insorgenza di casi?

Dalla risposta a questi quesiti si può evincere il ruolo dell'ambiente e dall'interazione con gli altri fattori scaturisce la quantificazione del rischio che è elemento irrinunciabile per la valutazione della necessità /opportunità di attivare misure di controllo e di prevenzione.

S3.5

AMBIENTE E RISCHIO INFETTIVO IN RIANIMAZIONE

Marone P., Carretto E.

Laboratorio di Batteriologia e Micologia -
Area Infettivologica. IRCCS S.Matteo, Pavia

L'ambiente ospedaliero (l'aria, l'acqua e le superfici) può rappresentare un'importante fonte di microrganismi patogeni per i pazienti ad alto rischio. La legionellosi, l'aspergillosi e la colite da *Clostridium difficile* rappresentano tre classici esempi di patologie associate a contaminazione dell'ambiente. In ospedale possiamo distinguere 4 aree a rischio infettivo: 1. a basso rischio; 2. a rischio moderato; 3. a rischio elevato; 4. a rischio molto elevato. Le unità di terapia intensiva rientrano nella terza categoria, pertanto richiedono strutture idonee, personale addestrato e adeguati interventi di pulizia, disinfezione e manutenzione. Non solo le legionelle ma anche altri batteri possono sopravvivere e moltiplicarsi nell'acqua. Numerose segnalazioni indicano nell'acqua di rubinetto la fonte di contaminazione nel corso di focolai epidemici di infezioni nosocomiali in terapia intensiva causate da *Pseudomonas*. Per usi specifici non dovrà essere utilizzata l'acqua di rubinetto, se non, in alcuni casi, opportunamente trattata con mezzi chimici o fisici. L'aria ambientale è un potenziale veicolo di trasmis-

sione di microrganismi quali *Aspergillus*, *M.tuberculosis* ed alcuni virus (VZV, influenza, morbillo). Il controllo della contaminazione si ottiene mediante la riduzione dell'apporto di microrganismi e la rimozione dei contaminanti. In particolare, appare a tale scopo indispensabile l'adozione di sistemi di ventilazione idonei che assicurino un ottimale ricambio dell'aria. Nelle camere di degenza di pazienti colonizzati o infetti da *C.difficile*, MRSA e VRE è stata dimostrata una pesante contaminazione delle superfici (letti, lenzuola, indumenti, porte, stetoscopi, termometri,...). Le misure indicate per contenere il rischio di trasmissione di questi microrganismi sono l'isolamento in camera singola o in alternativa il cohorting, il lavaggio delle mani e le precauzioni di barriera per il personale sanitario. Tali misure acquistano una particolare valenza nei reparti di terapia intensiva per le peculiari caratteristiche dei pazienti e la necessità di un frequente contatto operatore-paziente.

S3.6

CONTROLLI SU STRUMENTI SOTTOPOSTI A DISINFEZIONE

Vaiani R.

Microbiologia, Ospedale "A. Manzoni", Lecco

Gli strumenti che penetrano i tessuti sterili (artroscopi, laparoscopi e le pinze da biopsia) debbono essere sterili; gli strumenti che entrano in contatto con le membrane mucose e la cute non intatta (gastroscopi, colonoscopi, broncoscopi, cistoscopi) debbono essere sottoposti ad alta disinfezione (meglio sterilizzazione). Anche i manipoli delle apparecchiature dentistiche debbono essere sottoposti ad alta disinfezione o sterilizzazione.

In letteratura la trasmissione di infezioni dovuta a procedure endoscopiche è un evento raro. Per sapere se la gestione delle apparecchiature è corretta si deve: 1) Sapere quante sono le infezioni conseguenti ad endoscopia (attivando un registro delle infezioni con follow up di almeno 30 giorni); 2) Utilizzare procedure affidabili (seguire un protocollo di disinfezione accettato dalla ditta produttrice dell'endoscopio e validato da gruppi di riferimento) 3) Eseguire controlli microbiologici per valutare la presenza di batteri dopo disinfezione. Premessa la necessità del registro delle infezioni, il punto chiave sono le procedure; tra le migliori vi sono le linee guida APIC che tra l'altro prevedono: a)-pulizia con accurata spazzolatura dei canali; le spazzole devono essere sterili b)- risciacquo con acqua sterile; c)-dopo il risciacquo passare alcool etilico o isopropilico al 70%; d)-dopo il passaggio in alcool gli strumenti e i loro canali devono essere accuratamente

asciugati con aria ; e)-gli endoscopi vanno conservati in modo da ridurre al minimo la possibilità di accumulare umidità residua; f)-gli accessori riutilizzabili che penetrano le mucose, tipo pinze biotiche, per ogni paziente vanno puliti meccanicamente nel modo migliore (es. ultrasuoni) e sterilizzati a vapore. Per quanto riguarda i controlli microbiologici dell'endoscopia questi devono essere eseguiti a fine disinfezione, con l'apparecchio pronto per l'uso. Deve esistere un registro dei controlli in cui sono ben identificati, endoscopio, macchina per disinfezione, tipo di lavaggio e disinfezione, ciclo, operatore, volumi di liquido utilizzati e recuperati per il controllo microbiologico, operatore di laboratorio, risultati microbiologici. I punti critici del controllo microbiologico sono: 1)- fase preanalitica: la immissione di acqua nei canali per raccogliere eventuali batteri presenti richiede connessioni a tenuta per evitare spandimenti; 2)- il liquido va filtrato su membrana da 0.2 o 0.45 µm in contenitore chiuso (evitare che vengano aspirati su membrana batteri dell'aria); 3)- la valutazione dei risultati deve essere per singolo endoscopio (se le guaine interne sono rovinate i problemi sono dell'endoscopio e non del sistema)

relazioni

SESSIONE 4

Ruolo del servizio di Microbiologia Clinica nelle raccomandazioni per la pratica clinica

Giovedì 16 ottobre 2003, 9.00-13.00 Sala Giotto Palazzo Affari 3° piano

S4.1

IL CONTRIBUTO DEL MICROBIOLOGO AL MIGLIORAMENTO DEGLI ESITI CLINICI (CLINICAL OUTCOMES)

Giocoli G.

Gruppo di lavoro EBM AMCLI, Milano

Come altri addetti ai servizi diagnostici, i microbiologi clinici sentono l'esigenza di indicatori e di linee guida per raggiungere i traguardi di *outcome* additati dalla nuova cultura del governo clinico, una politica sanitaria incentrata sul miglioramento della qualità nell'assistenza (1). Ad essa concorrono tutte le figure professionali in campo sanitario e la parola *outcome* riguarda i risultati o esiti dei loro interventi in termini di salute e di costi. Nella realtà questo percorso è assai difficile, specialmente per ciò che concerne i test diagnostici, per i quali mancano o sono agli albori le ricerche per definirne gli esiti primari (la sopravvivenza, la guarigione, il benessere del malato) e finanche surrogati, come i loro effetti sulle scelte terapeutiche, l'uso delle risorse sanitarie, la mancanza di effetti avversi, ecc. (2). Sono invece numerosi gli studi sull'efficacia diagnostica (anch'essa un *outcome* surrogato), o almeno su quella sua componente di accuratezza che costituisce il presupposto dell'utilità clinica di un test.

L'accertamento della qualità in microbiologia clinica

I cardini di uno studio di validazione di una tecnologia sanitaria sono la chiara definizione dell'obiettivo e l'appropriato disegno (3). Come in altre branche della medicina, lo studio randomizzato e controllato è in infettivologia lo strumento epidemiologico più idoneo a fornire le prove di efficacia di procedure o di farmaci destinati a contrastare la minaccia batterica. Per quanto riguarda i test diagnostici e di screening la

situazione è molto più complessa: l'obiettivo di stimare l'accuratezza del riconoscimento di un'infezione è insidiato dalle limitazioni degli studi osservazionali utilizzati per questi scopi e dalla natura probabilistica dei risultati della ricerca applicata al malato (4). Nella seconda metà degli anni '90 varie revisioni sistematiche hanno messo in luce i gravi errori metodologici degli studi di validazione dei test e la diffusa sopravvalutazione dell'accuratezza; molta ricerca diagnostica si ferma infatti agli stadi preliminari, con scarsa aderenza alle realtà della pratica clinica (5).

Raccomandazioni per la pratica clinica

Mentre i risultati della ricerca farmacologica sono dunque rapidamente inseriti nelle raccomandazioni per la pratica clinica (onde la dovizia di linee guida in campo terapeutico) altrettanto non avviene nel campo diagnostico (6). Una delle conseguenze è che in infettivologia l'approccio alla diagnosi è ben lungi dal seguire criteri uniformi, come è stato di recente rilevato anche in Italia (7). E, mentre per le metodologie analitiche sono a disposizione numerosi protocolli aggiornati a cura di enti autorevoli (ASM, NCCLS, PHLS), sono carenti le raccomandazioni sull'uso appropriato dei test microbiologici.

Il contributo del microbiologo

Se l'accuratezza diagnostica è solo un *outcome* surrogato, rimane tuttavia essenziale per il buon esito della malattia e costituisce un ottimo punto di partenza per il miglioramento degli esiti clinici. Per una sua corretta definizione è richiesta una collaborazione interdisciplinare, soprattutto se si conviene che il riconoscimento di un'infezione non sempre si fonda sul singolo test microbiologico, ma sul suo valore aggiunto nei confronti d'indagini di diversa natura (es. semeiologiche, radiologiche, istologiche, ecc) (8). E mentre l'approccio interdisciplinare è il migliore per ottenere prove di efficacia dei test basate sulla documentazione e sul consenso, spetta alle singole specialità il controllo dell'affidabilità analitica del proprio armamentario metodologico, un presupposto di base da assicurare con rigidi protocolli e controllo di qualità.

L'iniziativa STARD

Le revisioni sistematiche sono la piattaforma delle raccomandazioni per la pratica clinica. Per renderne più agevole la preparazione, nel gennaio del 2003 una diecina di riviste mediche hanno richiamato l'attenzione degli studiosi sul documento STARD, acronimo di *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*. L'iniziativa ha lo scopo di aiutare gli autori degli studi di accuratezza diagnostica dei test ad esporre in modo completo e diligente i loro rapporti, con l'ausilio di una *checklist* e di un diagramma di flusso. Il protocollo STARD è stata preparato da 40 esperti internazionali, è disponibile sia in inglese che in italiano (9) e rappresenta senza dubbio un punto di riferimento per il microbiologo che desideri migliorare l'accuratezza diagnostica dei suoi test.

BIBLIOGRAFIA

1. Heard SR et al. Continuous quality improvement: educating ... Quality in Health Care 2001;10(Suppl II):ii70-ii78
2. Plebani M. E' possibile tracciare la rotta del cambiamento nel laboratorio clinico? Bioch Clin 2001; 25; 425-33
3. Knottnerus JA. Challenges in dia-prognostic research. J.Epid Comm Health 2002;56:340-1
4. Haynes RB. What kind of evidence is it that EBM advocates? BMC Health Services Research 2002; 2:3
5. Ljimer JG et al. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. JAMA 1999; 282:1061-6
6. Hernandez-Aguado I. The winding road towards evidence based diagnoses. J Epid Comm Health 2002;56:323-5
7. Marchetti D. Linee guida in microbiologia clinica. Microbiol Medica 2001; 16: 124 (relaz. al XXX Congr. AMCLI)
8. Moons KGM et al. Diagnostic studies as multivariable, prediction research. J.Epid Comm Health 2002;56:337-8
9. The STARD initiative. Versione italiana: <http://www.gimbe.org/Link/STARD.zip>

S4.2

ELABORAZIONE E VALUTAZIONE DELLE LINEE GUIDA E DEI REPORT DI TECHNOLOGY ASSESSMENT: UN MODELLO BASATO SULLE EVIDENZE

Conti A.A., Gensini G.F.

Dipartimento di Area Critica Medico Chirurgica,
Università degli Studi di Firenze.

Fondazione Don Carlo Gnocchi, IRCCS Centro S. Maria
agli Ulivi, Pozzolatico, Firenze.

Linee guida assistenziali

Le linee guida assistenziali sono raccolte ordinate ed organiche di raccomandazioni cliniche. Negli ultimi anni le linee guida assistenziali hanno acquistato una

popolarità crescente in quanto strumenti utili nell'indirizzare la pratica clinica, ed il numero delle linee guida pubblicate è salito in modo vertiginoso. Del tutto recentemente la preparazione e la diffusione delle linee guida ha ricevuto un impulso decisivo dalla Medicina Basata sulle Evidenze. L'autorevolezza di una linea guida dipende dalla forza delle evidenze e dal grado delle raccomandazioni in essa contenute. Una categorizzazione dei livelli delle evidenze è oggi necessaria anche per definire il campo di applicazione degli interventi assistenziali, le loro potenzialità ed i loro limiti. Una linea guida basata sulle evidenze costituisce un obiettivo rilevante del progresso delle conoscenze in Medicina anche perché deve essere obiettiva ed esplicita; laddove infatti le acquisizioni della ricerca clinica siano frammentarie, equivoche se non addirittura assenti, lo strumento linea guida lo deve dichiarare esplicitamente. Altrettanto esplicitamente deve essere documentato il grado di consenso del gruppo di lavoro su tali evidenze, ed eventualmente le aree di dissenso. Dal punto di vista gestionale ed economico le linee guida basate sulle evidenze si configurano come strumenti importanti non certo per abbattere in modo immediato e acritico i costi sanitari, quanto piuttosto per allocare con maggiore appropriatezza le risorse disponibili, finanziarie ma anche umane, tecniche e organizzative. L'impatto formativo di una linea guida assistenziale di buona qualità può risultare notevole non solo sugli operatori sanitari (ci riferiamo agli operatori sanitari in quanto una linea guida basata sulle evidenze tiene conto di tutti i professionisti della salute coinvolti nella gestione di una condizione patologica), ma anche sui pazienti e sui "caregivers". Lo strumento linea guida, per sua natura dinamico, deve essere infatti periodicamente revisionato ed aggiornato e per questo può quindi costituire un mezzo di educazione medica continua.

Percorsi clinici

I percorsi clinici (PC) sono programmi di gestione che esplicitano gli obiettivi per il paziente e mettono a disposizione la sequenza temporale degli interventi necessari per raggiungerli con efficienza ottimale. L'interesse per questi strumenti in medicina è nato nel campo dei sistemi sanitari legati al pagamento prospettico, in quanto essi sono stati ritenuti in grado di ottimizzare l'efficienza ospedaliera tramite la riduzione della variabilità nella pratica clinica, la razionalizzazione nell'utilizzazione delle risorse e il miglioramento della qualità di cura. Le principali componenti di ogni PC possono essere considerate la tempistica, le categorie di cura e i loro interventi, gli outcome intermedi e quelli a lungo termine, la documentazione della varianza. Il formato di presentazione più frequente dei PC è rappresentato dalla cosiddetta carta di Gantt, che delinea il processo di cura suggerito basandosi su una matrice di "incarichi a tempo". I principali obiettivi dei PC sono selezionare la migliore pratica clinica possibi-

le quando esistono inutili disomogeneità nella gestione di una determinata condizione, definire gli standard per la durata attesa della degenza e per l'utilizzo dei saggi diagnostici e dei trattamenti, analizzare le relazioni tra i differenti passaggi nel processo di cura con la finalità di individuare modalità per coordinare e ridurre il tempo impiegato nelle tappe limitanti la rapidità del processo stesso, fornire a tutto il personale sanitario un piano comune dal quale sia possibile evincere i vari ruoli specifici nell'ambito del processo di cura. I PC possono, inoltre, essere utilizzati come strumenti per una valutazione della appropriatezza degli interventi diagnostico-terapeutici, anche in considerazione della loro struttura, che richiede la compilazione di tutti i campi presenti da parte di ogni componente del gruppo multidisciplinare coinvolto, così da rendere facilmente ricavabili a posteriori i dati che testimoniano gli atti svolti. Un'altra funzione di questi strumenti è la facilitazione dell'implementazione delle linee guida, in quanto rappresentano una traduzione delle raccomandazioni direttamente "al letto del paziente".

Technology assessment

L'analisi critica delle tecnologie sanitarie, che va sotto il nome di "Technology Assessment", è un'attività tecnico-scientifica multidisciplinare condotta con l'obiettivo di valutare l'applicabilità, la sicurezza, l'efficacia ed i costi, come pure l'impatto sulla qualità della vita, delle tecnologie sanitarie utilizzate nell'assistenza dei pazienti. Per tecnologie sanitarie si intendono sia le procedure diagnostiche, che i presidi terapeutici farmacologici che gli interventi clinici invasivi. L'analisi viene condotta attraverso un approccio multidisciplinare e permette la produzione di resoconti strutturati (report) utili per la diffusione della valutazione basate sulle evidenze dei presidi sanitari disponibili. La raccolta di tali report consente anche di creare archivi di conoscenza condivisa. Le attività di Technology Assessment sono coordinate a livello internazionale dall'International Network of Agencies for Health Technology Assessment (INAHTA), una rete creata nel 1993 di cui fanno attualmente parte almeno 36 agenzie di tutto il mondo. Nella cornice metodologica della Medicina Basata sulle Evidenze, il Technology Assessment si staglia dunque come un nuovo strumento di valutazione, che permette di verificare quanto le tecnologie sanitarie siano utili per migliorare la qualità della salute, includendo l'analisi delle procedure e dei supporti organizzativi necessari per determinarne l'applicabilità e quindi l'impatto nelle diverse realtà cliniche, in termini complessivi di costo/utilità.

S4.3

INTEGRAZIONE TRA COMPETENZE MICROBIOLOGICHE E INFETTIVOLOGICHE NELLA FORMULAZIONE DI RACCOMANDAZIONI PER LA PRATICA CLINICA

Rizzi M.

*Unità Operativa Malattie Infettive,
Ospedali Riuniti di Bergamo*

Tra i principi metodologici usualmente citati come irrinunciabili per l'elaborazione di linee guida ricorre quello della interdisciplinarietà: nell'ambito delle malattie infettive, questo principio si deve tradurre nella gran parte dei casi nella collaborazione tra infettivologi e microbiologi.

Attualmente, in ambito infettivologico la raccolta di linee guida più importante per ampiezza e qualità è quella curata dalla Infectious Diseases Society of America (IDSA): nell'ambito di tale società, al 15 giugno 2003 erano stati elaborati 35 documenti (ed altri 21 erano in corso di elaborazione), per alcuni tra i problemi infettivologici più rilevanti; anche la IDSA, in due appositi documenti metodologici sulla preparazione di linee guida, ha citato la necessità di un approccio multidisciplinare: "... a range of experts that is sufficiently broad enough to adequately explore the topic ... it is desirable to include members of related disciplines ... to include members of relevant professional societies ...".

L'analisi di quanto prodotto nel corso del programma linee guida della IDSA permette di individuare alcuni problemi cruciali nella collaborazione tra infettivologi e microbiologi; il caso delle diarree di origine infettiva è particolarmente interessante, poiché in questa area la variabilità nella pratica clinica è ampia, è frequente il ricorso a procedure inappropriate, e molti degli accertamenti che vengono eseguiti sono poco rilevanti per la cura del paziente.

Gli obiettivi delle linee guida

Per molte sindromi infettive, come le diarree, gli obiettivi clinici e quelli di sanità pubblica coincidono solo in parte: alcune indagini microbiologiche possono essere irrilevanti per la cura del paziente, ma utili per l'igienista; l'elaborazione di linee guida richiede la collaborazione di clinici (che nel sistema di pagamento per prestazioni sono disincentivati dall'esecuzione di accertamenti non rilevanti per la cura del paziente ricoverato) laboratoristi (all'opposto incentivati ad estendere il volume di attività) ed igienisti (per il quale reparti clinici ambulatori e laboratori costituiscono irrinunciabili fonti di informazioni); obiettivi e priorità devono venire chiaramente definiti.

I destinatari delle linee guida

Anche limitando il campo alla fattispecie più semplice (e più comune) del paziente immunocompetente con diarrea acuta acquisita in comunità, le linee guida devono essere diversamente articolate per le diverse figure di clinici: ad esempio, in ambito ospedaliero possono più facilmente venire proposti approcci "multisteps" (ad esempio test per la lattoferina fecale, ed esami colturali per *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* solo in caso di risultati positivi), l'esecuzione di emocolture, indagini invasive. Ove sono presenti specialisti in malattie infettive, gli iter diagnostici proposti possono e devono essere più articolati e flessibili (più "careful clinical assessment", e meno "automatic orders").

La popolazione

L'applicazione indiscriminata di procedure diagnostiche standard è assai poco efficiente (in molte serie risulta positivo approssimativamente solo l'uno per cento dei campioni di feci sottoposti ad esame colturale): l'iter diagnostico deve essere differenziato secondo l'età del paziente, la sua situazione immunitaria, e la eventuale ospedalizzazione; negli ospedali italiani pare sia largamente ignorata la "regola dei tre giorni", elaborata nei primi anni novanta, che prescrive di non eseguire di routine coproculture standard (per *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*) nei pazienti con diarrea ospedalizzati da più di 3 giorni; un'altra ben nota "regola", che sembra più diffusamente applicata, riguarda la ricerca di *Clostridium difficile* nei pazienti con diarrea ospedalizzati da più di tre giorni.

BIBLIOGRAFIA

1. Gross PA. Practice guidelines for infectious diseases: rationale for a work in progress. Clin Infect Dis 1998;26:1037-1041.
2. Kish MA. Guide to development of practice guidelines. Clin Infect Dis 2001;32:851-854.
3. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis 2001;32:331-350.

S4.4

ACCERTAMENTI MICROBIOLOGICI PREVENTIVI ALL'INGRESSO IN COMUNITA' CHIUSE E IN OSPEDALE: L'EVIDENZA DISPONIBILE IN VIROLOGIA

Pauri P.

Servizio di Virologia, Ospedale Regionale Torrette,
via Conca, Azienda Umberto I, 60100 Ancona

Negli ultimi venti anni è stata posta un'attenzione particolare alla valutazione delle strategie di screening nella prospettiva di un miglioramento della qualità del

servizio e del rapporto costo-efficacia: l'evidenza ha dimostrato che i test dovrebbero essere utilizzati razionalmente e selettivamente. L'argomento è strettamente legato agli studi di *outcome*, termine con cui si intendono i risultati di interventi medici in termini di salute o di costi. (Linee Guida UK National Institute for Clinical Excellence 1993, Bissell 2000).

Aspetti da considerare

Effettuare uno screening significa rilevare ad uno stadio precoce della sua storia naturale una malattia a possibile carattere evolutivo, perciò accompagnata da sostanziale morbidità e mortalità in assenza di trattamento prima della comparsa della sintomatologia. Nella **valutazione** di qualsiasi screening bisogna tenere conto dell'*outcome* da misurare: riduzione della mortalità, miglioramento della qualità della vita, numero di soggetti da esaminare per prevenire un effetto avverso. Problemi diversi riguardano gli screening per l'ingresso in ospedale e quelli in comunità: in questi ultimi a guidare la scelta è il tasso di trasmissione dell'infezione ad altri soggetti, mentre nei primi prevalgono altre considerazioni, come l'utilità per il singolo paziente o la protezione dell'operatore. Bisogna inoltre tenere conto dei **potenziali danni** di uno screening dovuti a effetti collaterali del trattamento, alla scarsa utilità dello stesso nelle malattie non evolutive, agli effetti avversi della diagnosi precoce (es. ansietà), ai costi correlati ai test di conferma. Si deve peraltro sottolineare che uno screening su **popolazioni non a rischio** esalta la rilevazione di falsi positivi (probabilità pre-test molto basse). Infine non è da sottovalutare l'aspetto della corretta informazione per il paziente, che deve poter esprimere liberamente il proprio parere. Sono state proposte strategie per migliorare l'appropriatezza della richiesta (Linee Guida UK National Institute for Clinical Excellence 1993): **1.** educazione alla appropriata indicazione clinica e al ragionamento probabilistico; **2.** monitoraggio della richiesta da parte del laboratorio, con informazioni per il richiedente sul numero delle richieste e i costi correlati; **3.** modifica della scheda di richiesta per scoraggiare un'indiscriminata selezione di esami.

Accertamenti al momento del ricovero in ospedale

In particolare l'uso routinario di test all'ingresso in ospedale rappresenta un rilevante spreco, specie per quanto riguarda i pazienti chirurgici. I test al ricovero dovrebbero essere utili per rilevare condizioni occulte e per facilitare la diagnosi. L'evidenza dimostra però che i test non richiesti in base alla logica clinica sono raramente utili per la diagnosi differenziale, con rese molto basse ai fini di una modifica della gestione del paziente (Bareford 1990). Bisogna anche segnalare che, più che per il beneficio dei ricoverati, i test di screening infettivologico sono richiesti spesso per il supposto beneficio degli operatori (soprattutto nei reparti chirurgici), secondo un criterio di *medicina difensiva*.

Secondo il Piano Nazionale Linee Guida: **1.** l'esecuzione di uno screening infettivologico di routine per le infezioni virali trasmissibili (HBV, HCV, HIV) al ricovero non ha alcuna indicazione; **2.** sono invece indispensabili "precauzioni universali" per la protezione dal contagio professionale (D.M. 28/9/90) **3.** è indispensabile l'esatta definizione dei percorsi per la gestione dell'esposizione a liquidi biologici potenzialmente infetti.

Accertamenti al momento dell'ingresso in altre comunità

In questo campo le prove di efficacia sono praticamente inesistenti, salvo rare eccezioni (vedi: "Prevenzione e controllo delle infezioni da virus negli Istituti correzionali" in USA (MMWR 2003). L'argomento è importante ai fini della prevenzione delle infezioni comunitarie, in soggetti ad alto rischio di infezione da HBV, HIV, HCV, malattie sessualmente trasmesse e tubercolosi, perchè essi sono destinati successivamente a rientrare nella comunità. In generale, considerata la sensibilità dei test disponibili, sono molto elevate le possibilità di escludere l'infezione quando i risultati dello screening sono negativi. Quando invece si ottengono risultati positivi per HBV e HCV, i cui test sierologici sono dotati di specificità più modeste, si apre una delicata fase nella quale è necessario un corretto atteggiamento nei confronti della persona esaminata. In conseguenza, considerato il modesto potere predittivo positivo di questi esami, appaiono opportune valutazioni di costo-beneficio. Diverso è il caso dell'HIV in cui, a causa delle ottime caratteristiche del test, il valore predittivo positivo può raggiungere livelli elevati, anche quando la prevalenza dell'infezione è bassa. In genere però, per questa infezione è più agevole rilevare anamnesticamente comportamenti a rischio e pertanto modificare le probabilità pre-test in modo significativo e valutare l'utilità di terapia alla luce delle Linee Guida della Commissione Nazionale AIDS.

BIBLIOGRAFIA

1. Linee Guida UK National Institute for Clinical Excellence. Routine admission testing reference paper, aprile 1993. www.nice.org.uk
2. MMWR 2003. Prevention and control of infections with Hepatitis Viruses in Correctional Settings. www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr52011a1.htm
3. Bissel MG: Laboratory-related measures of patients outcomes: an introduction. Washington AACC press, 2000, 194 pp
4. Bareford D and Hayling A: Inappropriate use of laboratory services: long-term combined approach to modify request patterns. Br Med J 301: 1305-7, 1990

S4.5

ACCERTAMENTI MICROBIOLOGICI PREVENTIVI ALL'INGRESSO IN COMUNITÀ CHIUSE E IN OSPEDALE: L'EVIDENZA DISPONIBILE IN BATTERIOLOGIA

Ricci L.

Laboratorio di Microbiologia A.O. S.M. Nuova, Reggio Emilia

Gli interventi per la prevenzione delle infezioni comprendono l'utilizzo di **test di screening (1)** che individuano infezioni latenti, mentre i test diagnostici confermano o escludono la diagnosi in soggetti sintomatici. Gli screening preventivi possono migliorare lo stato di salute della popolazione, basti pensare ai benefici ottenuti con l'identificazione dei soggetti HbsAg positivi o delle gestanti portatrici di streptococchi di gruppo B **(2)**. Tuttavia inappropriate applicazioni od interpretazioni possono rivelarsi dannose (falsi positivi e falsi negativi) e provocare un dispendio di risorse **(3)**. Un compito importante del microbiologo consiste pertanto nella valutazione dell'efficacia diagnostica dei test di screening, ed in particolare della loro accuratezza **(4)**.

L'ingresso di persone in ospedale e in **comunità chiuse** (asili, luoghi di detenzione ...) è regolato ancora da norme che hanno avuto origine in situazioni o in orientamenti sanitari vecchi di decenni. Un significativo esempio di un processo di revisione guidato dalla ricerca delle prove di efficacia è fornito dalla recente abolizione dello screening sierologico per la **sifilide**. L'art. 93 della legge finanziaria 2001 (L388/2000) ha abolito quest'accertamento preventivo per i militari di leva, i detenuti e inoltre all'ingresso in ospedali o altre comunità chiuse. Tale provvedimento si è reso necessario per l'evidente cambiamento dell'epidemiologia nazionale ed il venire meno di condizioni che rendevano necessaria l'applicazione degli screening su queste categorie di soggetti. La regione Piemonte **(5)** ha recepito prontamente quest'articolo di legge e con provvedimento D.G.R. n 40 -1754 del 18-12-2000 ha limitato il test per la sifilide solo ai fini diagnostici od in caso di rischio evidente. Di questo provvedimento è stata valutata l'efficacia **(6)**. Su 350.000 ricoveri /anno non si è verificato nessun caso di sifilide; inoltre il provvedimento ha consentito un risparmio di 1271 miliardi di lire e non v'è stato nessun ostacolo di tipo formale od organizzativo per l'abolizione.

Altri esempi di screening riguardanti infezioni batteriche sono quello tradizionale per la **tubercolosi** o la nuova ricerca dei portatori di **Stafilococco aureo meticillino-resistente** (MRSA). Il primo è praticato da molti anni e resta tuttora un valido metodo di lotta ad

una malattia che appare tutt'altro che in regressione; si tratta però di renderlo più efficace mediante un aggiornamento delle tecnologie. Lo screening per l'MRSA è invece una necessità che va manifestandosi in seguito al dilagare delle resistenze batteriche che costituiscono una grave minaccia per le terapie intensive e in generale per la crescente popolazione di immunodepressi. ACPM, NYC Department of Health& Mental Hygiene Tuberculosis Control Program (7) ed altre istituzioni raccomandano il TST (Tuberculin Skin Testing) prima dell'ingresso in Ospedale per alcune categorie, tra le quali i soggetti HIV positivi, i diabetici, i leucemici, e altre persone con rischi sociali per la **tubercolosi**. Il test è tuttavia poco specifico e più utile per i casi di infezione latente che attiva; inoltre, eseguito su soggetti precedentemente vaccinati con BCG, può dare risultati falsamente positivi. Un limite importante per l'interpretazione del TST e di altri test è la mancanza di un gold standard di riferimento per le infezioni latenti. In base alla migliore evidenza attualmente disponibile sembra che migliori risultati siano ottenibili con il test immunospot enzimatico (ELISPOT). Con quest'indagine si determinata la presenza dell'antigene specifico delle cellule T di *Mycobacterium tuberculosis* non presente in *Mycobacterium bovis* (BCG) ed in altri micobatteri più virulenti (8). Un altro test attualmente disponibile è il QuantiFERON®-TB (QFT) basato sulla determinazione quantitativa della componente immune a reattività cellulo-mediata verso *Mycobacterium tuberculosis* ed il cui utilizzo negli screening è regolato da una linea guida dei CDC (9). Riguardo allo screening per **MRSA** nei pazienti chirurgici o prima dell'ingresso in Ospedale, un recente studio multicentrico dimostra la sua utilità prima dell'ammissione nell'unità di terapia intensiva (10). Da altre indagini ne risulterebbe l'efficacia anche se eseguito prima dell'ingresso in ospedale (11, 12). Tuttavia appaiono utili altri studi e in particolare una revisione sistematica.

In conclusione se l'EBM è un sistema di verifica dell'efficacia degli interventi sanitari, il decentramento alle Regioni delle iniziative sanitarie, il confronto tra professionisti e l'intervento delle associazioni professionali appaiono fondamentali per la pratica della prevenzione (13).

BIBLIOGRAFIA

1. Wilson JMG, Jungner G.
Principles and Practice of Screening for Disease.
WHO 1966
2. CDC Revision of Guidelines for the prevention of
Perinatal Group B Streptococcal Disease
February 15,2002;51(06):127
3. Grimes DA, Schulz KF.
Uses and abuses of screening tests
Lancet 2002; 359:881-84
4. Testing a Screening Test
Bandolier 1994
5. Regione Piemonte
Accertamenti sierologici per la sifilide
D.G.R. n 40 – 1754 18.12.2000
6. Demicheli Vittorio
Valutazione dei costi dello screening sierologico per la sifilide in Regione Piemonte: un'esperienza a buon fine
3° Conferenza Nazionale EBP, Verona 2003
7. NYC Department of Health& Mental Hygiene
Tuberculosis Control Program
Tuberculin Skin Testing for Suspected TB
February 2000
8. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, et al.
Comparison of T_{cel}-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. The Lancet 2003;361:1168-1173
9. CDC Guidelines for Using the QuantiFERON®-TB Test for Diagnosing Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection January 31, 2002/52 (RR02); 15-18
10. Lucet J. et al.
Prevalence and Risk Factor for Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at Admission to the Intensive Care Unit: Results of a Multicenter Study.
Arch Intern Med 2003; 163:181-188
11. Samad A, Banerjee D, Carbarns N, Ghosh S.
Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in surgical patients, on admission to a Welsh hospital. J Hosp Infect 2002 May;51(1):43-6
12. Kunori T, Cookson B, Roberts JA, Stone S, Kibber C.
Cost-effectiveness of different MRSA screening methods
J Hosp Infect 2002 Jul; 51(3):189-200
13. Valsecchi M.
Regioni a scuola di EBM per sconfiggere la burocrazia
Articolo Sanità, Sole 24 ore; gennaio 2003

relazioni

SESSIONE 5

Stato attuale della Microbiologia in Europa

Venerdì 17 ottobre 2003, 9.00-10.00 Sala Leonardo Palazzo Affari- piano -I
Sala Galileo Palazzo Affari 2° piano

S5.2

CONTINUING MEDICAL EDUCATION IN EUROPE. WHERE DO WE STAND?

Leibbrandt C.C.

*Past Secretary-General UEMS/EACCME
Graadt van Roggenstraat 33
NL - 6522 AW Nijmegen
e-mail: cc@leibbrandt.net*

The fundamental change in the last decades is the attitude of the patients and the public in general. Medical expertise of doctors is not being taken for granted any more. People and also governments and insurances want proof that the doctor is able to administer state-of-the-art medical care. There is constant pressure from governments, patients and consumer organizations that doctors make their effort in the maintenance of competence visible.

Governments, that want to prove that they care for quality practice, while at the same time reducing Health Care budgets, have jumped on this bandwagon and are putting CME requirements into legislation, because for them CME is an accessible way to measure competence and they are forced politically to do something.

The professional CME structure in most European countries has grown bottom-up during the nineties. National Specialty based Societies started programmes of accreditation of CME providers, awarding of credits to their members and setting standards, initially rather arbitrarily. No penalties were involved, just counselling. Presently these specialty based structures are being tied together in national CME authorities, usually implemented by the profession.

The UEMS (European Union of Medical Specialists) recognized this tendency early in the nineties and start-

ed establishing a European framework for structured CME. The UEMS European CME Charter of 1994 was a milestone in this process. This laid out the direction of CME policy for the later years and was followed in 2000 by the establishment of the EACCME (European Accreditation Council for CME). The EACCME acts as an umbrella structure for the national CME Authorities and makes it possible in Europe to exchange accreditation of providers and recognition of CME credits of doctors between the countries and - not unimportant - between the specialties.

References: www.uems.be www.eaccme.be

#

relazioni

SESSIONE COMUNALE AMCLI-SIBioC

Il laboratorio nella diagnostica cardiologica

Venerdì 17 Ottobre 2003, Sala Michelangelo, Palazzo dei Congressi, piano -I

SC.1

PATOLOGIE CARDIACHE AD Eziologia infettiva: DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

Nicoletti P., Fabio U.

Le patologie cardiache infettive sono rappresentate, nella maggior parte dei casi, dalle endocarditi seguite da quelle, più rare, che colpiscono il miocardio ed il pericardio.

Endocarditi

Da un punto di vista della diagnosi eziologica le infezioni nelle quali il laboratorio di microbiologia clinica ha dato fino ad ora un più importante contributo al clinico sono sicuramente le endocarditi per la facilità di avere il materiale biologico adatto alle procedure diagnostiche. Nell'ambito di tali procedure (dirette, indirette, molecolari) l'indagine principalmente eseguita è il classico esame colturale dato il ruolo preminente, anche se non esclusivo, svolto dai batteri.

Anche se l'eziologia prevalente varia a seconda della situazione clinica di base (principalmente fra valvole native, protesi valvolari nel periodo precoce e tardivo, tossicodipendenti endovena, pazienti immunodepressi ecc.) ed a seconda dei fattori di rischio (infezioni vie urinarie, manovre sul cavo orale, neoplasie del colon, diabete mellito ecc.), nella maggior parte dei casi (intorno al 90-95%) queste infezioni sono sostenute da Streptococchi, Stafilococchi aurei e non aurei, bacilli gram-negativi e più raramente miceti.

In una piccola percentuale di casi (intorno al 5%) le endocarditi sono sostenute da microrganismi a lento o difficile sviluppo come ad esempio microrganismi del cosiddetto gruppo HACEK, *Bartonella sp.*, *Abiotrophia spp.* ecc. o addirittura non coltivabili con i previsti metodi tradizionali, come *Chlamydia sp.*, *Coxiella sp.*, *Borrelia sp.*, *Mycoplasma sp.*, *Legionella sp.*, Micobatteri ecc. Alcune di queste forme cliniche

sono indicate come "endocarditi ad emocoltura negativa".

Il principale test per la diagnosi microbiologica delle endocarditi è costituito dall'emocoltura che però deve essere effettuata modificando alcuni aspetti metodologici (principalmente allungando i tempi di incubazione ed eventualmente eseguendo sub-colture al termine dell'incubazione) sì da consentire lo sviluppo anche dei patogeni "difficili ed inusuali". Nei casi in cui con il metodo tradizionale non si rilevi sviluppo batterico è necessario ricorrere a metodi colturali speciali (terreni per Micobatteri, *Legionella sp.*, colture cellulari ecc.). Per i microrganismi non coltivabili o nel caso di sospette forme da Clamidie, Coxiella, Legionella, Borrelia e/o in quelle rarissime sostenute da virus Cocksackie si può ricorrere anche a test sierologici utilizzando le varie note metodiche (immunofluorescenza, elisa, fissazione del complemento ecc.). Attualmente sono già pronti o in sviluppo numerosi test di biologia molecolare per facilitare la diagnosi eziologica delle forme sostenute appunto da microrganismi "difficili" o non coltivabili.

Infine sulla diagnostica microbiologica delle endocarditi vogliamo anche ricordare che in corso di intervento operatorio possono essere esaminati, sempre con metodiche colturali, valvole cardiache e/o emboli settici.

Miocarditi

Le infiammazioni che colpiscono il miocardio spesso coinvolgono anche il pericardio con una delle due forme che predomina sull'altra. Difficilmente nelle miocarditi infettive in laboratorio si riesce ad individuare l'eziologia che in prevalenza è costituita da agenti virali e fra questi in particolare *Enterovirus*, *Cocksackievirus* tipo B e, meno frequentemente, *Herpes simplex*, *Adenovirus* e *Citomegalovirus*. Più raramente le miocarditi sono sostenute da agenti patogeni batterici sia con meccanismo diretto (formazione di ascessi metastatici in corso di invasione del torrente circolatorio in particolare da Meningococchi, Salmonelle, Stafilococchi e Streptococchi) o come

effetto a distanza dovuto a tossine come nel caso di *C.diphtheriae* e *C.perfringens* che possono agire anche con meccanismo diretto (*C.diphtheriae* attualmente non è segnalato in Italia). Altre forme di miocardite ad eziologia batterica sono dovute ad invasione per contiguità da parte di quei microrganismi presenti nelle valvole cardiache in corso di endocardite. Altri agenti più rari possono essere *Legionella sp.*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* o *psittaci*. Nei pazienti immunocompromessi oltre alle forme secondarie a sepsi da batteri opportunisti sono state descritte forme da miceti (anche da aspergilli e criptococco) e da *Toxoplasma gondii*.

La diagnosi microbiologica si esegue mediante emocoltura nelle rare forme batteriche secondarie ad invasione del torrente circolatorio e mediante la ricerca dell'infezione primaria nelle forme secondarie alla produzione di tossine. Di più difficile evidenziazione sono le forme sostenute da virus poiché si può solamente ricorrere alla ricerca di anticorpi circolanti (aumento del titolo di 4 volte nel secondo campione o alto titolo in anticorpi della classe IgM) che però non danno risultati di certezza. La diagnosi eziologica in queste forme può essere fatta mediante tecniche biomolecolari (amplificazione e/o ibridazione in situ) eseguite su frammenti biotici ma ovviamente solo nei casi in cui la biopsia abbia una preminente giustificazione ai fini clinici (diagnostico-terapeutici) date le possibili gravi complicazioni secondarie a tale manovra.

Pericarditi

Anche nella pericardite, a causa delle difficoltà della diagnosi microbiologica, è raro identificare l'agente patogeno per cui nella maggior parte dei casi le forme vengono definite idiopatiche. Da un punto di vista eziologico le forme di pericardite sono sostenute in prevalenza dagli stessi virus che causano le miocarditi mentre per quanto riguarda quelle batteriche, oltre a quelli già menzionati per le miocarditi, bisogna prendere in considerazione anche il possibile coinvolgimento di micobatteri ed anaerobi. La diagnosi microbiologica presenta i problemi già visti per le miocarditi infatti anche in questo caso la ricerca di anticorpi circolanti non è sufficientemente certa e quella diretta con ricerche di virus, batteri, miceti o parassiti può essere tentata solo se c'è una indicazione clinico terapeutica al prelievo di essudato e/o tessuto pericardico. E' ovvio che, in assenza di indicazione specifica del medico curante, in questi casi le indagini devono prevedere la ricerca del più ampio spettro possibile di agenti patogeni.

SC.2

DIAGNOSI MOLECOLARE: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE FUTURE

Pistello M.

Dipartimento di Patologia Sperimentale,
Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia
Università degli Studi di Pisa

La disponibilità di metodi molecolari per la rilevazione di acidi nucleici ha avuto un notevole impatto nel settore della diagnostica microbiologica. Numerosi metodi qualitativi e quantitativi sono già entrati in uso nella maggior parte di laboratori diagnostici e di ricerca contribuendo significativamente a diagnosi e stadiazione di malattie infettive, al *management* del paziente ed alla comprensione dei meccanismi patogenetici e di interazione agente patogeno-ospite. A fronte di questa realtà ormai consolidata, la diagnostica molecolare è un settore estremamente dinamico che, a seguito di una fattiva ed intensa ricerca applicata, si assiste alla continua introduzione di nuove tecnologie ed affinamento e miglioramento delle prestazioni di quelle già esistenti. Ciò si traduce nella rapida obsolescenza di tecniche ed apparecchiature già presenti sul mercato e su offerta e disponibilità di nuove apparecchiature in costante e rapido aumento.

In questo ambito, notevoli risorse sono investite nello sviluppo di sistemi molecolari quantitativi basati su tecnologia *real-time* e di apparecchiature per estrazione automatica. Il tutto nell'ottica della completa automazione ed integrazione della filiera: estrazione degli acidi nucleici dal campione in esame, test analitico, elaborazione ed emissione del risultato.

L'ottimizzazione dell'intero processo si traduce inoltre nella riduzione di tempi di analisi, lavoro manuale e costi. In questa presentazione verranno illustrati i principali metodi molecolari tradizionali e più innovativi presenti nel mercato e la loro applicabilità nel settore della diagnostica microbiologica. Particolare enfasi verrà posta sui metodi molecolari *real-time* applicati alla quantizzazione dei principali agenti infettivi responsabili di patologie in ambito cardiologico e sull'importanza del dato di laboratorio nella formulazione di diagnosi di infezione/malattia e nella definizione di un possibile trattamento terapeutico.

SC.4

**BIOCHEMICAL MARKERS
AND CARDIAC DISEASES****Panteghini M.***Laboratorio Analisi Chimico Cliniche I,
Azienda Ospedaliera "Spedali Civili", Brescia, Italy*

The incidence of cardiovascular disease has decreased in the recent years with a better understanding of the pathophysiology of acute coronary syndromes (ACS), widespread implementation of lipid lowering drugs, improved treatments such as stent placements, and new therapeutic regimens such as the statins, low molecular weight heparins, and platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors. Nevertheless, it remains today as the leading cause of morbidity and mortality in the Western world. Biochemical markers of cardiac disease continues to grow in importance in the diagnosis and management of patients with ACS, as witness by the recent incorporation of cardiac troponin into new international guidelines for patients with ACS and in the redefinition of myocardial infarction. The laboratory plays a pivotal role in proper selection and interpretation of available marker assays, depending on the creation of evidence-based knowledge on test utilization and sources of variation. Despite the success of cardiac troponin, there is still a need for development of early markers that can reliably rule out ACS from the emergency room at presentation. Furthermore, with the population getting older, and more patients are surviving episodes of ACS, the incidence of congestive heart failure is growing at a dramatic rate. This is an area where biochemical tests have traditionally not played any role. With the characterization of the natriuretic peptides, this promises to be an emerging field of Laboratory Medicine.

comunicazioni orali

SESSIONE I

Appropriatezza e nuovi standard tecnologici in Microbiologia

Mercoledì 15 ottobre 2003, 9.00-13.00 Sala Michelangelo Palazzo dei Congressi, piano-I

CO1.1

USO DI PANNELLI MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE DI AGENTI EZIOLOGICI DI GASTROENTERITI ACUTE VIRALI

Minosse C.; Zaniratti M.S.; Calcaterra S.; Carletti F.; Pisciotto M.; Narciso P.; Anzidei G.; Capobianchi M.R.

*Istituto Nazionale per le Malattie Infettive
"L. Spallanzani" Roma.*

Numerosi sono i virus coinvolti nell'insorgenza di gastroenteriti acute, tuttavia un'alta percentuale di queste rimane non diagnosticata a causa della mancanza di adeguati metodi di laboratorio.

In questo lavoro è stata effettuata una valutazione retrospettiva su campioni di feci giunti nel nostro laboratorio nel periodo compreso fra il Dicembre 2000 e il Settembre 2002, conservati a -80°C .

Gli acidi nucleici sono stati estratti con il "Boom method". I primers utilizzati nelle reazioni di amplificazione sono stati scelti dalla letteratura. L'identificazione del virus è stata confermata attraverso l'analisi RFLP o attraverso il sequenziamento diretto dei prodotti di PCR.

Il numero totale di campioni analizzati è stato 103.

In base alle specifiche richieste mediche relative ad ogni campione, solo 15 casi (14.6%) sono stati correttamente diagnosticati. Tuttavia, applicando l'intero pannello di PCR da noi messo a punto, sono risultati positivi ad uno o più virus 37 campioni (35.9%): 10 (9.7%) sono risultati positivi agli Enterovirus; i Rotavirus sono stati documentati in 12 casi (11.6%); Astrovirus e Norovirus sono stati trovati in 4 e 5 casi (3.9% e 4.8%) rispettivamente. Gli Adenovirus sono

stati identificati in 10 campioni (9.7%); l'HAV è stato trovato in 2 casi (1.9%); nessun caso è risultato HEV-positivo. Genomi virali multipli sono stati identificati in 5 casi (4.8%): Rotavirus+Adenovirus (1 caso), Enterovirus+Rotavirus (2 casi), Rotavirus+Astrovirus (1 caso), Rotavirus+Adenovirus+Enterovirus (1 caso). I risultati indicano un'alta prevalenza di virus in feci di pazienti con ANEG, comprendenti più frequentemente Rotaviruses, Adenoviruses ed Enteroviruses. Non è rara la coinfezione di virus. Sulla base della specifica richiesta medica, solo meno della metà dei casi sarebbe diagnosticata come associata a virus, mentre applicando l'intero pannello di PCR si amplifica la possibilità di identificare virus. I nostri dati indicano una urgente necessità di stabilire un pannello molecolare diagnostico specifico e sensibile, in grado di valutare la presenza dei più diffusi virus enterotropi.

CO1.2

BIOBANKING: L'ESPERIENZA DELLA MICROBIOLOGIA DEL CRO DI AVIANO

Tedeschi R., Bidoli E.*, Zanussi S., Bortolin M.T., Pratesi C., Pivetta E., D'Andrea M., Ros M., Averna P., Varaschin P., Crepaldi C., Costanzo C. & De Paoli P.

*Unità Complessa di Microbiologia-Immunologia e Virologia & *Epidemiologia,
Centro di Riferimento Oncologico, IRCCS, Aviano.*

Introduzione e Scopo. La disponibilità di campioni biologici (siero, plasma, cellule PBMCs e biopsie) accuratamente raccolti e conservati, catalogati in un database successivamente incrociabile rapidamente ad archivi esterni è fondamentale per l'organizzazione di vari studi (coorte, caso-controllo, localizzazione di infezioni e sopravvivenza).

Proponiamo la nostra esperienza nell'intento di realiz-

zare un sistema di Biobanking con alcune sue applicazioni pratiche.

Materiali e Metodi. Un prelievo di sangue viene effettuato nei pazienti inclusi nei diversi protocolli di studio, in quelli oncologici e/o HIV+ in follow-up. Si ricavano almeno due (o più) aliquote di siero, plasma e PBMCs, immediatamente storate a -80°C . Alcuni studi prevedono inoltre una biopsia (epatica, rinofaringea). Database separati ed in formati diversi raccolgono informazioni anagrafico/cliniche incrociate mediante una chiave anagrafica tramite il SAS® e fornite anonime agli utenti. Archivi esterni al reparto (es. epidemiologici) possono essere inclusi ai fini di stratificazione, confondimento e interazione. Istruzioni, in chiaro e peer-reviewed dagli utenti stessi, gestiscono l'input, il merge, le statistiche ed i report, con possibilità per gli utenti di creare funzioni aggiuntive.

Risultati. Da Ottobre 1999 a Dicembre 2002 sono stati raccolti campioni di plasma, siero e PBMCs con diversa tempistica da 613 pazienti HIV+ e 384 pazienti HIV- afferenti al nostro Istituto. Sono stati classificati: 70 NHL HIV+ e 142 NHL HIV-; 16 HD HIV+ e 35 HD HIV-; 11 MM HIV- e 1 MM HIV+; 17 KS HIV+; 42 UCNT. Applicazioni pratiche del metodo: studio sulla correlazione dei livelli di HCV-RNA su siero e su biopsia epatica in pazienti HIV-HCV coinfeziti durante il follow-up clinico-terapeutico (Tedeschi et al. J Clin Microbiol); studio sull'associazione tra reattività anticorpale verso *Borrelia* e NHL cutaneo (Dal Maso et al. submitted).

Considerazioni conclusive. Il Biobanking consente di accumulare un largo numero di campioni per studi sierologici e molecolari di varia natura, di aumentare la potenza degli studi e rendere possibili esperienze intercollaborative e interscambi di materiale. E' inoltre di stimolo ad un controllo di qualità per lo stoccaggio dei campioni. Tale sistema, in continuo aggiornamento, richiede un notevole impegno sia nel trattare i campioni e i dati che nel raccogliarli (schede pazienti) e non meno delicati sono gli aspetti etici e legali.

CO1.3

DIAGNOSI DI LABORATORIO DI AMEBIASI MEDIANTE REAZIONE POLIMERASICA A CATENA (PCR)

Calderaro A., Bommezzadri S, Incaprera M., Piccolo G., Zuelli C., Guégan R., Villanacci V.,¹Pirali F.,²Viviani G., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università di Parma, Viale Gramsci 14 43100 Parma;

¹Secondo Dipartimento di Patologia Chirurgica, Spedali Civili, Università di Brescia, via Spedali Civili 1, 25123 Brescia;

²Ospedale S. Orsola Fatebenefratelli, Brescia.

Introduzione. Al fine di superare i limiti dell'indagine microscopica e di ridurre i tempi necessari per una corretta identificazione di *E. histolytica*, agente eziologico di amebiasi intestinale ed extra-intestinale e di *E. dispar* non patogena, è stato introdotto nel nostro laboratorio un idoneo saggio basato sulla reazione polimerasica a catena (PCR).

Materiali e Metodi. Sono stati sottoposti all'esame microscopico, colturale, ricerca degli antigeni specifici di *E. histolytica* e *E. dispar* e alla PCR, campioni di feci e aspirato da ascesso epatico di un paziente con addome acuto e appendicite complicata di incerta eziologia e campioni di feci e biopsie intestinali ottenuti da un secondo paziente con sospetto morbo di Crohn. Per la PCR, il DNA è stato estratto con il sistema "HPPT" (Roche), amplificato con i "primers" EHD2/EDh26 (*E. histolytica*) e i "primers" EHD2/ED27 (*E. dispar*) e il prodotto (135 pb) rivelato mediante elettroforesi in gel di agarosio. Anticorpi specifici anti *E. histolytica* sono stati ricercati in campioni di sangue di entrambi i pazienti.

Risultati e Conclusioni. Nel primo caso (sospetta amebiasi), la PCR ha consentito di confermare la diagnosi sierologica di amebiasi extra-intestinale (titolo 1:1024) rivelando la presenza del DNA di *E. histolytica* nell'aspirato da ascesso epatico quando i metodi tradizionali (esame microscopico e colturale) hanno dato esito negativo.

Nel secondo caso (sospetto morbo di Crohn), la PCR è stata di valido supporto all'esame microscopico e colturale nell'identificazione rapida di *E. histolytica* isolata dal campione di feci. Inoltre, il ritrovamento del DNA dell'ameba nelle biopsie della mucosa colica ha consentito di porre rapidamente una corretta diagnosi di amebiasi confermando la diagnosi sierologica (titolo 1:1024). Infine, nelle biopsie coliche dello stesso paziente è stato ritrovato anche il DNA di *Brachyspira pilosicoli* e di *B. aalborgi* dimostrando, per la prima volta in assoluto, una coinfezione da ameba e spirochete intestinali.

comunicazioni orali

SESSIONE 2

Tipizzazione batterica

Mercoledì 15 ottobre 2003, 9.00-13.00 Sala Giotto,
Palazzo Affari 3° piano

CO2.1

RIBOTIPIZZAZIONE AUTOMATICA NELLA TIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

**Barbarini D., D'Avolio A.*, Pillitteri L.,
Carretto E.**

Laboratori Sperimentali di Ricerca, Area Infettivologica,
IRCCS Policlinico "San Matteo", Pavia e (*) Dip. Discipline
Med.-Chir. Malattie Infettive, Ospedale "Amedeo di Savoia",
Università degli Studi di Torino

Stenotrophomonas maltophilia (SM) è un patogeno opportunisto, che causa per lo più infezioni polmonari o sistemiche (sepsi). Occasionalmente isolato in pazienti comunitari, è assai più frequente in ambito nosocomiale, ove può manifestarsi con microepidemie dovute alla sua buona sopravvivenza ambientale (in particolare in soluzioni acquose). Le sue particolari caratteristiche di resistenza agli antibiotici e la sua diffusibilità raccomandano, in presenza di suoi isolamenti ripetuti, la messa in atto di procedure di sorveglianza e controllo. Il microbiologo dovrà essere in grado di identificarlo correttamente ed, eventualmente, di tipizzarlo. Nel presente lavoro ci si è proposti di valutare l'applicabilità di una metodica molecolare, quale la ribotipizzazione con sistema automatico, nella identificazione e tipizzazione di 43 ceppi di SM isolati in differenti ambiti ospedalieri. In particolare, sono stati scelti sia ceppi fra loro correlati epidemiologicamente (ad esempio isolati dallo stesso paziente) che ceppi fra loro sicuramente non correlabili. Al fine di valutare gli enzimi più discriminanti, cioè in grado di fornire profili genomici polimorfici, abbiamo analizzato 8 ceppi con gli enzimi di restrizione *EcoRI*, *PvuII*, *PstI* e *BamHI*. Gli ultimi due hanno consentito la generazione di pattern polimorfici: con *PstI* si sono ottenute 4-8 bande, una sola delle quali monomorfa, e con *BamHI*

analogamente 4-8 bande, due delle quali monomorfe. Dopo la fase di selezione degli enzimi, sono state condotte due singole digestioni enzimatiche con *PstI* e *BamHI* sui 43 isolati. Il primo enzima ha consentito di suddividere i ceppi in 13 gruppi, mentre il secondo in 15. L'analisi combinata dei risultati ottenuti con i due enzimi ha raggruppato i ceppi in esame in 24 cluster. La tipizzazione così ottenuta è risultata in perfetta concordanza con il dato epidemiologico atteso, dimostrando che la ribotipizzazione automatica, condotta con almeno due enzimi di restrizione, può considerarsi una metodica di tipizzazione efficace per isolati di SM.

CO2.2

BURKHOLDERIA CEPACIA COMPLEX IN UN CENTRO FIBROSI CISTICA ITALIANO: EPIDEMIOLOGIA E DECORSO CLINICO NEI PAZIENTI INFETTATI CON DIFFERENTI RECA LINEAGES DI *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA*

**Manno G.¹; Dalmastri C.²; Tabacchioni S.²;
Lorini R.¹; Minicucci L.¹; Romano L.¹;
Giannatasio A.¹; Chiarini L.² e Bevivino A.².**

Dipartimento di Pediatria, Università di Genova, Istituto
G. Gaslini, Genova¹;

Unità di Biotecnologie, C.R. Casaccia, Enea, Roma².

L'epidemiologia di *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) è stata determinata in 75 pazienti seguiti presso il Centro Fibrosi Cistica (FC) dell'Istituto G. Gaslini di Genova. E' stato valutato inoltre l'andamento clinico rispetto alle differenti specie e genomovars del Bcc, nei pazienti FC infettati. Tutti i ceppi dello studio sono stati isolati da colture espettorato mediante metodiche

microbiologiche convenzionali, quindi sono stati analizzati per la determinazione del genotipo mediante il polimorfismo del gene *recA* e, successivamente, tipizzati per la clonalità mediante RAPD. *B. cenocepacia* è risultata la specie predominante isolata dai pazienti FC infettati con Bcc nel centro di Genova. Delle altre otto specie comprese nel Bcc, solo pochi isolati risultavano *B. cepacia* genomovar I, *B. stabilis* e *B. pyrrocinia*. Dei quattro *recA* lineages di *B. cenocepacia*, la maggior parte dei pazienti è risultata infettata con ceppi appartenenti ai lineages IIIA e IIID, mentre solo pochi pazienti erano presentavano il lineage IIIB. La diffusione interpersonale di Bcc tra i pazienti CF è risultata prevalentemente a carico dei ceppi di *B. cenocepacia*, in particolare i *recA* lineages IIIA e IIID. Al centro FC di Genova, la mortalità dei pazienti FC infettati con Bcc è risultata significativamente più alta della mortalità dei pazienti non infetti con Bcc. Tutti i decessi sono avvenuti in pazienti con *B. cenocepacia*, ad eccezione di un paziente infettato con *B. cepacia* genomovar I. Tra *B. cenocepacia*, le infezioni sostenute dai lineages IIIA e IIID sono state associate ad un più alto tasso di mortalità, rispetto a quelle sostenute dal lineage IIIB. Non sono state osservate differenze significative nell'andamento della funzionalità respiratoria, peso corporeo e tasso di mortalità, tra pazienti infettati con *B. cenocepacia* IIIA rispetto a quelli con *B. cenocepacia* IIID.

mucosa cronica, perdita di peso, rettorragia, sospetto carcinoma del retto (4 casi) e con sospetto morbo di Crohn (1 caso), sono stati sottoposti a colonscopia. Uno dei 5 pazienti è deceduto per tromboembolia polmonare. Le biopsie rettali dei 5 pazienti sono state sottoposte ad esame istologico e, insieme ai campioni di feci di 4 dei 5 pazienti, ad estrazione del DNA seguita da amplificazione (PCR 16S) specifica del genere *Brachyspira* e analisi dei frammenti di restrizione (RFLP) degli ampliconi (RFLP-PCR). Inoltre, aliquote degli stessi campioni, sono state utilizzate per l'isolamento delle spirochete utilizzando un metodo messo a punto nel nostro laboratorio.

Risultati e Conclusioni. L'esame istologico delle biopsie intestinali dei 5 pazienti ha evidenziato l'adesione di microrganismi spiraliformi agli enterociti. L'RFLP-PCR condotta sui campioni biologici ha mostrato un pannello di restrizione specifico di *B. aalborgi* (4 casi) e di *B. aalborgi* + *B. pilosicoli* (1 caso). Spirochete sono state isolate dai campioni di feci e biopsie rettali e identificate fenotipicamente e mediante RFLP-PCR come *B. aalborgi* (4 casi) e *B. pilosicoli* + *B. aalborgi* (1 caso). In conclusione, questo studio riporta per la prima volta l'isolamento di *B. aalborgi* (4 casi) da feci umane dimostrando la presenza di questa spirocheta non solo nelle biopsie intestinali. Viene infine descritta per la prima volta una infezione mista da *B. pilosicoli* + *B. aalborgi*.

CO2.3

DIAGNOSI DI LABORATORIO DI SPIROCHETOSI INTESTINALE DA BRACHYSPIRA AALBORGII

Calderaro A., Villanacci V¹., Bommezzadri S., Piccolo G., Zuelli C., Incaprera M., Guégan R., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma, Viale Gramsci 14 43100 Parma;

¹Secondo Dipartimento di Patologia Chirurgica, Spedali Civili, Università di Brescia, via Spedali Civili 1, 25123 Brescia.

Introduzione. La spirocheta *B. aalborgi*, recentemente considerata potenziale agente eziologico di spirochetosi intestinale umana (SIU), è stata isolata fino ad oggi in soli due casi al mondo da biopsie intestinali. In questo studio riportiamo la descrizione di 5 casi di SIU da *B. aalborgi* in pazienti italiani e per la prima volta in assoluto l'isolamento della spirocheta da feci umane.

Materiali e Metodi. Cinque pazienti con diarrea

comunicazioni orali

SESSIONE 3

Infezioni Nosocomiali e controlli ambientali

Giovedì 16 ottobre 2003, 9.00-13.00,
Sala Leonardo Palazzo Affari piano - I
Sala Galileo Palazzo Affari 2° piano

CO3.1

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *LEGIONELLA* NELLE INFEZIONI NOSOCOMIALI E COMUNITARIE

Franzin L.

Sezione Malattie Infettive, Università di Torino.
Ospedale "Amedeo di Savoia",
Corso Svizzera 164, 10149 Torino.

Introduzione: La modalità più comune della trasmissione della polmonite da *Legionella* è l'inalazione di aerosol contaminato proveniente da acqua di doccia e di rubinetto. Trattandosi di batterio acquatico ubiquitario con serbatoio ambientale, la tipizzazione molecolare dei ceppi di *Legionella* isolati dal paziente e dall'ambiente è fondamentale in quanto permette di stabilire la relazione di clonalità dei ceppi epidemiologicamente correlati e di riconoscere la sorgente di infezione. In questo lavoro viene presentata una rassegna delle tecniche molecolari utili allo scopo e la nostra esperienza applicata in casi di legionellosi di origine nosocomiale e comunitaria.

Metodi: I ceppi clinici e ambientali sono stati isolati con procedure adottate nel nostro Laboratorio da un ventennio, mediante l'uso combinato di vari terreni (BCYE, BMPA e MWY) e di diversi trattamenti. I ceppi sono stati tipizzati con metodi sierologici; gli isolati di *L. pneumophila* sierogruppo 1 sono stati anche tipizzati con anticorpi monoclonali. I ceppi clinici e ambientali correlati isolati in 4 episodi di infezione nosocomiale e in uno comunitario sono stati esaminati con PFGE (pulsed field gel electrophoresis) e con RAPD-PCR (random primers amplified polymorphic DNA). In un caso ospedaliero sono state anche usate AFLP (amplified fragment length polymorphism), f-AFLP (fluorescent-AFLP analysis) e il

sequenziamento del gene *mip*.

Risultati: Le tecniche molecolari hanno dimostrato che i ceppi isolati dal paziente e quelli ambientali correlati presentavano lo stesso profilo, mentre risultavano differenti rispetto a quelli non correlati. La validità delle tecniche dipendeva dal loro potere discriminante e dalla loro sensibilità.

Conclusione: La tipizzazione molecolare dei ceppi ha consentito di riconoscere in maniera inequivocabile la sorgente di infezione nei 5 episodi studiati. Si sottolinea l'importanza della ricerca colturale dai campioni clinici; la disponibilità dei ceppi clinici e ambientali consente infatti la loro tipizzazione con tecniche molecolari che sono di grande utilità ai fini epidemiologici.

CO3.2

STUDIO SIEROEPIDEMIOLOGICO SU PRESUNTI CASI NOSOCOMIALI DI LEGIONELLOSI PRESSO LA CASA DI RIPOSO DI LISSONE

**Panuccio A., Bellasio A., Biagiola P., Lazzaro E.,
Marrone A., Pasquali D.**

U.O. Immunologia e Virologia
Laboratorio Sanità Pubblica di Milano

Scopo L'indagine sieroepidemiologica avviata sul suddetto centro ha preso origine dal rilievo di alcuni pazienti deceduti in un arco molto ristretto di tempo, per sospetta legionellosi, e dal rilevamento di alcuni ceppi di *Legionella pneumophila* nelle condutture idriche dell'edificio. Il controllo sierologico ha coinvolto 274 soggetti della casa di cura di cui 107 pazienti e 167 dipendenti.

Metodologia Per l'effettuazione degli esami di laboratorio ci siamo avvalsi dei reattivi (metodica IFA) forniti dalla casa produttrice tedesca Poiesys, che ci ha permesso di testare i campioni per la definizione del

titolo anticorpale, con i 14 sierotipi di *Legionella Pneumophila* suddivisi in 4 mix. Ogni mix raggruppa i seguenti sierotipi.

MIX 1: sierotipi 1,4,6,8 MIX 4: sierotipi 10,12,14

MIX 2: sierotipi 2,3,5,7 MIX 3: sierotipi 9,11,13

Per la diluizione di saggio dei sieri ci siamo attenuti alla metodica allegata al test: - diluizione di screening 1/100 (positività scarsamente significativa) ed ulteriori diluizioni a partire da 1/320 in caso di positività riscontrata alla dil. 1/100.

Positività significativa per sospetta infezione recente: $\geq 1/320$

Risultati Il campione è stato suddiviso in due sottopopolazioni: popolazione pazienti e popolazione dipendenti. La popolazione dei pazienti ($n=107$) risulta a prevalenza femminile, essendo composta da 83 persone di sesso femminile e 24 di sesso maschile. I reattivi o debolmente reattivi alla diluizione 1/100 sono risultati 28, di cui 9 presentavano positività $\geq 1/320$.

Pertanto sul campione pazienti esaminato si è riscontrata una positività ($\geq 1/320$) dell'8,4% così suddivisa sui 4 mix:

mix 1: 7 (64%) mix 2: 2 (18%)

mix 3: 1 (9%) mix 4: 1 (9%)

Il numero totale delle positività (11) riscontrate sui mix risulta maggiore di 9 (corrispondente al n° di campioni positivi) in quanto 2 sieri reagivano con più di un mix. Anche per la popolazione dei dipendenti rappresentata da 167 soggetti (139 F, 28 M) è stata applicata la medesima procedura tecnica. Allo screening alla diluizione 1/100 sono risultati positivi o debolmente positivi 28 campioni di cui 5 alla dil. $\geq 1/320$.

Pertanto la percentuale di positività significativa si staglia al 3%. Le positività riscontrate sui 4 mix risultano così distribuite:

mix 1: 0 mix 2: 0 mix 3: 1 (25%) mix 4: 4 (75%)

Analizzando il campione nella sua globalità si ottengono le seguenti percentuali di reattività:

Reattività globale: 5,1% (14 campioni su 274).

Reattività dei campioni sui vari mix: 16 (2 campioni hanno reagito con più di un mix allo stesso titolo)

mix 1: 7 (44%) mix 2: 2 (12.5%)

mix 3: 2 (12.5%) mix 4: 5 (31%)

Dai dati ottenuti, si può evincere che:

La popolazione dei pazienti risulta percentualmente più reattiva (8 % contro 3%) rispetto a quella dei dipendenti, in ragione della età più avanzata della prima.

Nella popolazione pazienti la risposta più reattiva si è ottenuta con il mix 1 (sierotipi 1,4,6,8) mentre nella pop. dipendenti ha prevalso il mix 4 (sierotipi 10,12,14).

Una susseguente indagine più approfondita consistente nel saggiare ogni campione risultato positivo ai mix ($\geq 1/320$), con i 14 singoli sierotipi di *Legionella P.* ha evidenziato, sia pure a titolo più bassi, una risposta immunitaria maggiormente rivolta verso i sierotipi

4,8,12,14, risultato che convalida quanto ottenuto saggiando preliminarmente ogni siero con i 4 mix.

Considerando la risposta anticorpale complessiva al titolo 1/100, il mix 4 (10,12,14) con 42 reattività (comprese le deboli) ha ottenuto la maggiore rappresentatività.

Conclusioni I risultati ottenuti possono essere considerati in linea con altre indagini sierologiche effettuate in Italia e all'estero anche se a onor del vero si rilevano in alcuni lavori delle discrepanze legate spesso ai metodi utilizzati. In mancanza di isolamento del batterio nell'uomo nei casi clinicamente sospetti, lo studio sierologico retrospettivo e l'isolamento culturale del batterio dall'ambiente risultano solamente indicativi e quand'anche i due collimassero, essi risulterebbero solo presuntivi di avvenute infezioni allorquando la risposta immunitaria contro il sierotipo od i sierotipi incriminati, coincidono con il sierotipo isolato a livello ambientale.

Non sussistendo tutti e due questi elementi ossia, isolamento e tipizzazione del batterio nell'uomo, isolamento e tipizzazione del batterio nell'ambiente implicato, lo studio sierologico retrospettivo consente di intervenire con una base di discussione più ampia negli studi epidemiologici di ambienti confinati, in particolare modo quando non è imputato il sierogruppo 1 responsabile di circa il 70% dei casi clinicamente manifesti.

CO3.3

LA PROCALCITONINA COME INDICATORE DI SIRS, SEPSI E SHOCK SETTICO

Rossetti R., Corsini G.

U.O. Microbiologia, Spedali Riuniti, Azienda 3, Pistoia

Scopo

Verificare la validità della determinazione della procalcitonina come indicatore diagnostico di sepsi, sepsi severa e shock settico, a supporto della diagnosi clinica.

Metodo

È stato definito un protocollo di studio che prevedeva il reclutamento di tutti i pazienti ricoverati nel reparto di terapia intensiva dell'ospedale di Pistoia nel primo semestre 2002 su cui è stata eseguita la determinazione della procalcitonina nel sangue a giorni alterni, con il test quantitativo LUMitest[®] PCT (B·R·A·H·M·S, Berlino), contemporaneamente alla rilevazione dei parametri clinici e di laboratorio considerati dai rianimatori. Erano considerati indici di SIRS quelli indicati dalla Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (1992).

Il valore di PCT era correlato al quadro clinico di SIRS, Sepsis o Shock settico per verificarne l'utilità

diagnostica in presenza di un suo innalzamento. I pazienti arruolati nello studio sono stati complessivamente 27.

Risultati

In 17 pazienti non è mai stata fatta diagnosi clinica di SIRS, sepsi o shock settico e la PCT riscontrata in questi casi ha avuto valori compresi fra 0,08 e 2,6, di cui solo 6 hanno superato il valore soglia di 0,5 ng/ml.

Abbiamo osservato un totale di 16 condizioni positive che si sono verificate in 10 pazienti (in alcuni di loro i quadri clinici indicati si sono verificati più volte in momenti diversi); in 13 casi è stato isolato un ceppo batterico presumibilmente responsabile del quadro clinico con valori di PCT sempre superiori a 0,5 ng/ml: in 2 rilevazioni il valore era compreso nell'intervallo 0,5-2 ng/ml, in 7 il valore era compreso nell'intervallo 2-10 ng/ml e nelle altre 7 era >10 ng/ml.

Conclusioni

La nostra esperienza conferma i dati presenti in letteratura ed incoraggiano verso ulteriori indagini con una casistica maggiore in quanto, anche nella nostra esperienza, la procalcitonina sembra un parametro importante nella definizione di gravi quadri clinici infettivi od infiammatori sistemici.

comunicazioni orali

SESSIONE 4

Ruolo del servizio di Microbiologia Clinica nelle raccomandazioni per la pratica clinica

Giovedì 16 ottobre, 9.00-13.00, Sala Giotto
Palazzo Affari 3° piano

CO4.1

VALUTAZIONE DEL SAGGIO ENTEROVIRUS NUCLISENS EASYQ REAL-TIME NASBA SU CAMPIONI CLINICI

**Medici M.C., Martinelli M., Abelli L.A.,
Arcangeletti M.C., Valcavi P., Pinardi F.,
De Conto F., Calderaro A.,
Dettori G. e Chezzi C.**

*Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e
Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Parma,
Viale Antonio Gramsci, 14 - 43100 Parma.*

I metodi molecolari per la rivelazione di enterovirus (EV) in campioni clinici offrono il vantaggio rispetto al metodo colturale convenzionale di rivelare EV difficilmente o affatto coltivabili e di fornire i risultati nel giro di 24 ore; essi pertanto possono essere utili per il trattamento tempestivo del paziente.

In questo studio è stato valutato il saggio Enterovirus NucliSens EasyQ Real-Time NASBA basato sull'impiego della tecnologia di amplificazione NASBA in associazione alla rivelazione mediante "molecular beacons" in tempo reale.

Al saggio di specificità tutti i campioni clinici (3 feci e 2 secrezioni respiratorie) contenenti virus a RNA diversi da EV, hanno dato esito negativo mediante Real-Time NASBA. Il saggio di sensibilità, condotto mediante Real-Time NASBA in triplicato ed in tre giorni diversi su diluizioni seriali di RNA estratto da una sospensione fecale negativa per EV addizionata di una sospensione di virus ECHO 6 (concentrazione finale 10^5 TCID₅₀/ml), ha dato costantemente esito positivo fino alla diluizione contenente 1 TCID₅₀/ml di EV e meno costantemente rispetto all'nRT-PCR in presenza di 0,1 TCID₅₀/ml. Impiegato su 45 campio-

ni clinici (32 feci, 6 liquor, 7 secrezioni respiratorie), Real-Time NASBA ha dato esito concordante con l'nRT-PCR in 43 campioni (36 positivi e 7 negativi) e discordante in 2 campioni che sono risultati Real-Time NASBA negativi e nRT-PCR e/o esame colturale convenzionale positivi, rivelando una sensibilità del 94,7% e una specificità del 100%. Impiegato su 7 campioni del "QCMD EV Proficiency Programme 2002" contenenti EV a diverse concentrazioni, Real-Time NASBA ha concordato con l'esito positivo in 6 casi; al contrario ha dato esito negativo su un campione contenente $3,6 \times 10^{-1}$ TCID₅₀/ml.

Grazie alla rapidità e semplicità di esecuzione (3 ore per il completamento della singola fase della Real-Time NASBA rispetto a 6 ore per le tre fasi dell'nRT-PCR) oltre a buona specificità e sufficiente sensibilità, Enterovirus NucliSens EasyQ Real-Time NASBA si propone come una conveniente alternativa all'nRT-PCR per la rivelazione di RNA di EV in tipi diversi di campioni clinici.

comunicazioni orali

SESSIONE COMUNALE AMCLI-SIBioC

Il laboratorio nella diagnostica cardiologica

Venerdì 17 Ottobre 2003, 10.00-13.00 Sala Michelangelo,
Palazzo dei Congressi, piano -I

CO6.1

THYROID PROFILE EVALUATION AND POSTOPERATIVE ATRIAL FIBRILLATION

Storti S., Cerillo A.G., Mariani M., Giannelli I., Fontani G., Fusani L., Parri M.S., Kallushi E., Clerico A., Biagini A.

Istituto di Fisiologia Clinica del CNR -
Ospedale "G. Pasquinucci", via Aurelia Sud, 54100 Massa

Objective. Increasing evidences suggest that thyroid metabolism has a major role on the prognosis of cardiac patients. Cardiac surgery is a well recognized cause of thyroid dysfunction. This study evaluates the role of thyroid profile evaluation in the preoperative assessment of cardiac surgery patients.

Methods. Free triiodothyronine (fT3), free thyroxine (fT4) and thyroid stimulating hormone (TSH) were assayed in 107 consecutive patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) by the AxSYM® (Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Abbott Park, USA) Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA); serum samples, collected in serum separator tubes, were immediately centrifuged and stored at -20°C till the analysis was performed. All the samples from the same patient were analyzed together in the same session in order to minimize the inter-assays variations.

Results. A strong correlation was found between low fT3 concentration at admission and postoperative atrial fibrillation (AF), that occurred in 33 (30.8%) patients. An older age ($p=0.03$), no therapy with β -blockers ($p=0.08$), chronic obstructive pulmonary disease ($p=0.08$), lower left ventricle ejection fraction ($p=0.09$), and lower fT3 concentration ($p=0.001$) were all univariate predictors of postoperative AF. On multivariate analysis, low fT3 resulted to be the most important independent predictor of postoperative AF

(OR 4.425; 95% CI, 1.745-11.235; $p=0.001$).

Conclusions. Our data show the existence of a strong, previously unrecognized, relationship between low fT3 at admission and AF after CABG. These finding remarks the importance of thyroid profile laboratory evaluation in patients undergoing CABG, in order to reduce postoperative AF risk.

Reference. Lein I, Ojamaa K. Mechanism of disease: thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 2001; 344:501-509

CO6.2

PREVALENCE AND CLINICAL PROFILE OF CARDIAC MYOSIN-BINDING PROTEIN C GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY IN TUSCANY.

Girolami F°; Passerini I°; Mariottini A°; Olivetto J.*; Cecchi F*.; Vargiu D*.; Torricelli F°.

°Cytogenetics and Genetics Unit, Azienda Ospedaliera Careggi, Florence, Italy.

**Myocardial Diseases, Azienda Ospedaliera Careggi, Florence, Italy;*

Objectives: We studied the clinical and genetic features of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) caused by mutations in MYBPC3 in 57 consecutive patients from Italy.

Background: HCM is an autosomal dominant disorder characterized by unexplained left ventricular hypertrophy, usually asymmetric and involving the interventricular septum. More than 130 mutations in nine different genes encoding sarcomere proteins have been

identified; studies on Japanese and French families have shown that HCM caused by MYBPC3 mutations may have a delayed onset and is usually benign. However, genotype-phenotype relationship in other populations remains unclear.

Methods: All 35 exons of MYBPC3 were screened by DHPLC followed by automatic sequencing in 57 consecutive patients with HCM. The diagnosis was based on two-dimensional echocardiographic identification of a hypertrophied, non dilated left ventricle, in the absence of another cardiac or systematic disease capable of producing the magnitude of wall thickening evident.

Results: Overall, we identified 8 MYPC3 mutations in 7 patients (a 12% prevalence). Six mutations were novel (IVS18+1C>T, insT753, A522T, V771M, E165D, R1241L), and not detectable in 100 normal controls, thus excluding the possibility of polymorphisms; two (A522T and V771M) were found in eterozigosity in the same patient. The remaining two mutations have been previously reported (Q969X, IVS23+1A >G). Average age at diagnosis in the 7 patients was 40.1 ± 13.6 ; echocardiographic features and outcome were variable. Six of the eight patients had a benign outcome and family history; one (E165D, male, age 42), is currently in NYHA functional class III due to end stage progression of the disease; and one (IVS18+1C>T, female, age 54) had severe functional limitation.

Conclusions: In a regional HCM population from Italy, MYBPC3 mutations were common and were associated with a broad spectrum of clinical and echocardiographic manifestations. Most of the mutations had not been previously described, including 2 occurring in the same patient.