

corso pre-congressuale

CP.1

ASPETTI CLINICI DELLE GASTROENTERITI INFETTIVE

Dionisio D.

*Unità Operativa di Malattie Infettive,
Presidio Ospedaliero di Pistoia*

Le affezioni gastroenteriche da batteri, virus, protozoi, elminti continuano a rappresentare, nella società occidentale, rilevante problema di sanità pubblica. In rapporto agli spostamenti delle popolazioni esse tendono, anzi, ad un maggiore impatto. Per molti anni le infezioni intestinali causate da microrganismi opportunisti hanno anche rappresentato problema maggiore nei pazienti immunodepressi con AIDS. Oggi, pur in era di terapia antiretrovirale di combinazione (HAART), la diarrea è ancora sintomo ricorrente nelle persone HIV-infette, e il 2.8% di 15.000 pazienti ospedalizzati con malattia diarroica in New York City nel 1998 ospitavano patogeni intestinali. Al contrario, nelle aree geografiche dove le terapie anti-HIV permangono non disponibili (maggioranza dei Paesi in via di sviluppo), queste infezioni svolgono tuttora ruolo critico nella morbidità e mortalità dei pazienti con AIDS (di cui rappresentano prima manifestazione sin nel 70%-90% dei casi). Comunque, l'effetto antiparassitario della HAART è indiretto e non sempre associato ad eradicazione. Anche nei Paesi sviluppati, pertanto, recidive intestinali in pazienti con ridotta conta delle cellule CD4 a seguito di fallimento o discontinuazione della HAART sono riportate comunemente.

Nei pazienti immunocompetenti il decorso clinico, con o senza supporto antibiotico in ordine alle diverse eziologie (usualmente monomicrobiche), è, in assenza di fenomeni di resistenza ai farmaci, di norma benigno e senza tendenza a recidiva. Viceversa, sintomi di diarrea cronica e perdita di peso in pazienti in immunodeficienza cellulo-mediata severa ($< 100 \text{ CD4/mm}^3$ per AIDS o altre patologie) esitano spesso in diagnosi di infezioni singole o miste da cryptosporidium, microsporidia, giardia, micobatteri non tubercolari, cytomegalovirus o altri agenti convenzionali., sempre di difficile controllo, potenzialmente fatali e spesso recidivanti. Quelli citati non sono, comunque, gli unici patogeni: sono infatti sempre più spesso segnalate infezioni da patogeni animali non riportati nell'uomo o da agenti precedentemente non descritti. Questi non di rado si associano a patogeni convenzionali risultando così difficile la definizione di ruolo. Ad ulteriore com-

plicazione, "vecchi" patogeni quali toxoplasma, leishmania o pneumocystis, possono causare selettivo coinvolgimento intestinale nel soggetto immunodepresso. Uno o più patogeni enterici (virus, batteri, protozoi, e funghi) sono stati dimostrati nel 44%-68% dei pazienti con AIDS e sintomi gastrointestinali. La diagnosi di queste infezioni richiede una combinazione di coproculture, esami coprologici per uova e parassiti, e biopsie endoscopiche multiple per microscopia ottica e, possibilmente, elettronica. Con tale approccio, infezioni miste (piuttosto che singole) sono di norma diagnosticate in pazienti severamente immunodepressi.

CP.2

ASPETTI EPIDEMIOLOGICI: GENERALITÀ

Fabio U.

*Università di Modena e Reggio Emilia,
Dip.to Scienze Biogenistiche e Microbiologiche*

Le infezioni gastro-enteriche comprendono sindromi infettive provocate, in larga maggioranza, dalla ingestione di alimenti contaminati e causate da batteri, virus e protozoi. In piccola proporzione sono rapportabili a trasmissione interumana. Rientrano quindi in prevalenza in quadri nosografici e sindromi un tempo denominati "tossinfezioni alimentari" e, più recentemente, "malattie a trasmissione alimentare" (MTA), corrispondenti, nei Paesi anglosassoni, ai termini "food-borne diseases" o "food-borne illnesses".

La valutazione della incidenza o, più genericamente, della frequenza delle gastro-enteriti rappresenta un dato di notevole interesse epidemiologico e socio-economico, ma di complessa e difficile rilevazione a causa di tutta una serie di fattori. Le gastro-enteriti rappresentano, nell'ambito delle MTA, un evento estremamente comune e globale. Sono state calcolate in oltre 250 le sindromi rapportabili al consumo di cibi contaminati con un elenco di agenti causali in continua espansione. La sintomatologia passa da forme lievi e sfumate a quadri clinici di notevole serietà. La maggioranza dei casi di lieve o media gravità generalmente sfuggono agli organi di controllo anche per la loro frequente sporadicità. Focolai epidemici anche limitati sono comunemente registrati, ma l'agente eziologico viene identificato con sicurezza in un numero ristretto di casi.

A livello mondiale stime abbastanza recenti ed attendibili (Alterkruse, 1997; Novar, 1998) riferiscono di

“episodi diarroici”/anno valutabili attorno a 3-5 miliardi, più frequenti nella fascia infantile. I bambini con età inferiore ai 5 anni possono presentare, nelle aree sottosviluppate, da uno a dieci episodi/anno con una letalità complessiva pari a 5-10 milioni di individui. La contemporaneità del fattore “malnutrizione” amplifica di circa 30 volte il fenomeno con una letalità di 11.000 bambini/giorno!. Con specifico riferimento ad aree ad elevato sviluppo (USA) il CDC di Atlanta (2004) riporta 76 milioni di sindromi gastro-enteriche/anno con 300.000 ricoveri ospedalieri e 5.000 decessi. Tutte le statistiche esistenti sono largamente sottodimensionate ed imprecise sia per le caratteristiche patologiche delle sindromi che per la reale difficoltà di praticare censimenti attendibili. Maggiore attendibilità presentano le statistiche relative ad episodi epidemici, statistiche molto utili, perché spesso consentono una esatta definizione diagnostica e la messa in evidenza di importanti variazioni comparse in microrganismi già noti con possibilità di operare una precisa subtipizzazione o di evidenziare riemergenze di agenti già conosciuti od ancora di registrare le comparsa di microrganismi “nuovi”. Un concetto va tuttavia ribadito e precisamente che la maggior parte dei casi di gastro-enteriti infettive è costituita da forme realmente od apparentemente isolate o sporadiche.

Le epidemie “moderne” presentano in genere caratteristiche che le differenziano da quelle tradizionali e che spesso ostacolano il percorso diagnostico e la definizione eziologica. Alcune delle caratteristiche epidemiologiche attuali possono essere così sintetizzate: la contaminazione deriva da errori nella catena di produzione; la carica microbica infettante è generalmente bassa con tasso di attacco medio o basso e molti casi inapparenti; la comparsa non è contemporanea e rapida, ma diluita nel tempo; la distribuzione dei casi non è locale, ma interregionale od addirittura internazionale.

La eziologia delle gastroenteriti è soggetta a periodiche revisioni ed aggiornamenti. Limitandoci per brevità alla componente batterica (rilevante e meglio conosciuta), è possibile addivenire ad una classificazione in gruppi operativi. Ad un primo gruppo sono ascritti gli agenti batterici sicuramente dimostrati agenti eziologici di gastro-enterite (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* (patotipi ETEC, EPEC, EIEC, EHEC), *Vibrio* (*cholerae*, *parahaemolyticus*), *Campylobacter* (*jejuni*, *coli*), *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium difficile*,.....). La maggior parte dei laboratori è in grado di isolare ed identificare questi batteri. Nel secondo gruppo figurano batteri “associati” ad episodi diarroici e reputati enteropatogeni, ma non accettati universalmente, sia per la non rispondenza ai postulati di Koch (mancanza di un modello animale) e carenza dei criteri classici associati ai patogeni gastro-enterici (definiti meccanismi di entero-patogenicità o sicuro rapporto causa-effetto); il ruolo di questi batteri rimane incerto per il possibile ritrovamento di stipiti patogeni o

saprofiti nell’ambito della stessa specie (*Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli* (patotipo EAEC), *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp.....).

Il terzo gruppo comporta le maggiori incertezze; si tratta di norma di specie considerate saprofiti dell’intestino, ma attualmente emergenti come causa sia pure infrequente di diarrea (*Bacteroides fragilis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella* (*pneumoniae*, *oxytoca*), *Providencia alcalifaciens*, *Hafnia alvei*.....). Al proposito va precisato che le nostre conoscenze sul microbiota intestinale sono tutt’altro che complete. I metodi analitici convenzionali e le tecniche molecolari dimostrano la presenza nell’area enterica di 400-500 specie batteriche, 30-40 delle quali rappresenterebbero il 99% della popolazione locale. Censimenti effettuati con metodiche avanzate (analisi metagenomiche) sembrano dimostrare l’esistenza di una vasta aliquota della popolazione batterica intestinale sino ad ora ignota, aliquota che sfugge all’isolamento colturale convenzionale e che potrebbe rappresentare la parte più importante e consistente del microbiota intestinale stesso (Zengler et al. 2002, Breitbart et al. 2003, Rappè et al. 2003). Queste acquisizioni, unitamente alla continua evoluzione delle popolazioni (umana, animale e microbica) ed alle modificazioni ambientali e tecnologiche sottolineano la complessità e la inevitabile approssimazione ed instabilità degli aspetti epidemiologici di questo settore.

CP.3

ASPETTI EPIDEMIOLOGICI: IL CICLO BIOLOGICO NELLE PATOLOGIE INFETTIVE ALIMENTARI

Cirillo G.

Arpa, Forlì

Le gastro-enteriti rappresentano il capitolo di maggior peso ed interesse nell’ambito delle malattie indotte da alimenti (MTA). Vengono suddivise in avvelenamenti, infezioni ed infestioni. Gli avvelenamenti sono provocati da sostanze tossiche presenti nei tessuti di alcuni animali e/o vegetali oppure adesi alla loro superficie durante la produzione, confezionamento e trasporto. Le infezioni sono provocate da virus ed agenti similvirali, microrganismi (batteri, miceti, protozoi ed alghe monocellulari) o da prodotti del metabolismo presenti nel soma (endodotossine) o eliminate nel mezzo (esotossine). Le infestioni sono invece stati morbosi provocati da elminti (Tenie, Ossiuri, etc.).

L’insorgenza di un episodio morboso riconducibile al consumo di alimenti attiva un percorso complesso con l’applicazione di una serie di procedure sanitarie di cui

l'esecuzione delle analisi di laboratorio rappresentano solo una parte. L'indagine epidemiologica effettuata dagli organi di Sanità Pubblica mira a raccogliere elementi che aiutino ad arrivare alla conoscenza della causa (agente etiologico) che ha scatenato il fatto e delle motivazioni che l'hanno provocato.

I punti utili all'indagine si rifanno a una conoscenza dei microorganismi patogeni, del loro meccanismo d'azione, della loro patogenicità, etc. In apposite Tabelle, sottoposte ad aggiornamenti periodici, sono indicati: il tempo d'incubazione, i sintomi, le matrici alimentari preferibilmente contaminate ed i presunti agenti eziologici. Queste tabelle possono essere utili al Microbiologo per indirizzarlo verso il tipo di ricerca da effettuare. L'indagine epidemiologica inizia dopo la denuncia della malattia (obbligatoria per quasi tutte le malattie infettive), denuncia che spesso non viene effettuata proprio per la brevità, a volte, dell'episodio e dall'esito favorevole. Di qui la cospicua sottostima riportata da tutte le fonti epidemiologiche. Secondo dati dei CDC americani nel 2002 la maggioranza delle MTA sono state provocate da *Campylobacter*, *E. coli* (STEC) O157, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* e da protozoi come *Cryptosporidium parvum* e *Cyclospora cayetanensis*.

L'insorgenza di un episodio epidemico è solo la fase conclusiva e manifesta di un percorso che vede coinvolti oltre gli alimenti, la matrice vegetale o animale da cui derivano, il modo con cui vengono confezionati, conservati e trasportati e le caratteristiche dell'ambiente. Questi elementi compongono e definiscono il Ciclo Biologico che, con dovute variazioni si ripete per ogni agente eziologico in causa e la cui conoscenza è utile non solo per le pratiche di prevenzione e controllo alimentare, ma anche per indirizzare la ricerca del laboratorio di microbiologia.

Vengono riportati i cicli biologici degli agenti eziologici batterici più frequentemente causa di MTA nelle nostre zone, come *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enteropatogeni, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Staphylococcus aureus*, oltre ad elminti parassiti come *Tenia* ed *Enterobius vermicularis*.

Nelle fasi conclusive vengono presentati gli Organismi e gli Enti che, nell'ultimo quarto di secolo, sono stati istituiti sorti per il controllo e monitoraggio continuo di queste affezioni: L'OMS e la FAO hanno creato nel 1963 il Codex Alimentarius allo scopo di sviluppare standards e linee guida orientate a proteggere la salute dei consumatori. Negli USA presso il CDC di Atlanta esiste il Food Net che è un forum di sorveglianza attiva per informare gli operatori dei casi confermati da tests di Laboratorio relativi agli episodi tossinfettivi. Osservatori epidemiologici si sono sviluppati in ogni Nazione come reti di flusso dati da Centri periferici a Centri di Eccellenza a loro volta collegati. Ricordiamo infine, perché ci riguarda più da

vicino, Il Sistema internazionale di sorveglianza di batteri enteropatogeni EnterNet che si dirama da Centri Nazionali, a strutture sovraregionali, regionali e periferiche per raccogliere dati microbiologici ed epidemiologici relativi ai principali enterobatteri patogeni.

CP.4

LA DIAGNOSTICA BATTERIOLOGICA

Nicoletti P.

A.O. Careggi, Lab. Microbiologia e Virologia, Firenze

Le infezioni gastroenteriche rappresentano la seconda causa di morbilità e mortalità nel mondo. Quelle batteriche possono essere sostenute da una grande varietà di agenti eziologici e pertanto possono porre complessi problemi diagnostici. Attualmente con le conoscenze acquisite sul ruolo svolto da molti microrganismi, in passato non conosciuti come enteritogeni, è possibile fare diagnosi in un numero di casi sensibilmente più elevato.

Il rischio di acquisire una forma gastroenterica varia con l'età, le condizioni di vita, le abitudini personali, fattori geografici ecc. Nella relazione sarà presa in considerazione la diagnosi batteriologica delle forme diarroiche più importanti nella nostra realtà epidemiologica come quelle più frequenti sostenute da *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., quelle meno frequenti sostenute da *Shigella* spp. e *Yersinia* spp., quelle al momento più rare sostenute da *E. coli* (VTEC ecc.) ed infine anche quelle rarissime ed inusuali. Saranno anche presi in considerazione i problemi legati alla diagnostica in corso di eventi epidemici di tossinfezioni alimentari e la diagnostica batteriologica nelle forme diarroiche ospedaliere. Una corretta diagnostica batteriologica deve indirizzare le sue principali risorse in funzione dell'epidemiologia locale e della conoscenza dei principali e noti fattori di rischio presenti nei pazienti ambulatoriali ed in quelli ricoverati.

Anche se la diagnosi batteriologica può apparire di scarsa importanza per il singolo paziente, essendo la maggior parte dei casi sostenuti da forme autolimitanti che non necessitano di terapia antibiotica, l'esame delle feci, attraverso l'identificazione dell'agente patogeno, fornisce informazioni fondamentali per risalire alla fonte dell'infezione e quindi attuare misure appropriate per impedire il diffondersi o il ripetersi di eventi epidemici.

La mancata diagnosi batteriologica di una forma di diarrea può portare ad un ritardo nel trattamento o ad un inappropriato trattamento empirico. Per certi patogeni la terapia antimicrobica appropriata può portare alla riduzione dei giorni di malattia e può ridurre la mortalità nelle forme invasive. L'emergenza delle resi-

stenze ai farmaci antimicrobici, specialmente per certi batteri, ha ulteriormente evidenziato la necessità di una diagnosi batteriologica con l'isolamento dei microrganismi ed il saggio della loro sensibilità agli antibiotici. I dati sulle resistenze cumulati e divulgati serviranno così come guida alla scelta della terapia empirica "ragionata".

Anche la sola identificazione del microrganismo causa dell'infezione è oltremodo importante poiché costituisce di per sé la principale guida ad una terapia appropriata che eviti possibili complicanze: la probabilità di dare complicanze come la sindrome uremico-emolitica aumenta se si usano certi antibiotici nella terapia iniziale della diarrea da *E.coli* O157; usare antibiotici, quando e se non necessari, nella cura delle salmonellosi può portare a prolungamento dello stato di portatore o ad una più alta frequenza di ricadute; la terapia inappropriata con antibiotici può portare ad induzione di resistenze non solo nei patogeni causa di gastroenterite, ma anche in altre specie, vedi per esempio come l'uso della vancomicina nelle coliti associate ad antibiotici (diarree da *C.difficile*), porti a maggior colonizzazione e diffusione di enterococchi vancomicina-resistenti. Da questo deriva il fatto che una corretta diagnosi eziologia porta ad un uso più appropriato degli antibiotici a tutto vantaggio della salute del paziente unita anche ad una favorevole ricaduta economica. Anche un risultato negativo per la ricerca di batteri patogeni ha valore poiché indirizza verso la ricerca di altre cause sia infettive che non infettive ed anche in questo caso previene l'uso di farmaci non necessari.

Un aspetto particolare assume la diagnosi batteriologica di forme diarroiche che si presentano in ambiente ospedaliero. Nella maggior parte dei casi si tratta di colite associata ad antibiotici, ma non dobbiamo dimenticare la possibilità di forme diarroiche anche in forma epidemica (talora originate da mense ospedaliere) e che possono assumere aspetti molto gravi e particolarmente difficili da controllare specialmente in certi reparti più a rischio (vorrei solo ricordare a titolo di esempio episodi epidemici descritti prevalentemente "ma non solo" nei paesi in via di sviluppo e sostenuti da *Salmonella* spp., *E.coli* EPEC, ETEC e VTEC, *Shigella* spp. ecc.).

In questi casi una diagnosi batteriologica precoce ed un attento studio epidemiologico sono essenziali per bloccare e comunque limitare la diffusione dell'evento epidemico e questo deve farci anche riflettere sulla reale necessità o meno di applicare la famosa "regola del tre" nelle diarree nosocomiali.

Particolare importanza assume la diagnosi batteriologica quando si sospetti una tossinfezione alimentare: il laboratorio deve essere allertato e deve eseguire in tempi rapidi una ricerca ad ampio spettro (compatibile ovviamente con le caratteristiche cliniche degli episodi) in modo che gli organi preposti abbiano le informazioni necessarie per mettere in atto efficaci misure di controllo dell'epidemia stessa.

Nella diagnostica batteriologica, oltre all'isolamento del patogeno, assume particolare importanza epidemiologica l'approfondimento dell'esame mediante identificazioni sierologiche e, anche se in casi ben determinati, tipizzazioni biomolecolari. Nei casi per i quali è previsto, e limitato agli antibiotici appropriati, è importante concludere l'iter diagnostico con l'esecuzione dell'antibiogramma.

Le principali metodiche per una corretta diagnosi eziologica delle forme gastroenteriche di origine batterica sono tuttora quelle basate sulle tradizionali colture e ricerca di tossine; talora e per certi patogeni anche un esame batterioscopico può dare informazioni importanti considerando anche il fatto che il risultato è il più precoce che sia ottenibile in batteriologia.

I materiali nei quali più spesso può essere utile e necessario ricercare il patogeno responsabile di gastroenterite oltre alle feci sono il sangue (nelle forme sistemiche), e gli alimenti. L'iter diagnostico, dal prelievo all'esecuzione degli esami e la diagnostica mediante ricerca di tossine, sono oggetto di altre relazioni del corso stesso.

CP.5

LA DIAGNOSTICA MEDIANTE RICERCA DI TOSSINE

Dei R.

Dipartimento Sanità Pubblica - sezione Microbiologia, Università di Firenze

Buona parte delle gastro-enteriti infettive hanno una patogenesi esotossica; nella maggioranza dei casi la tossinogenicità non è una caratteristica specie-specifica, per cui un riconoscimento che arrivi solo alla specie deve essere ritenuto del tutto inadeguato. L'approccio diagnostico classico comporta l'isolamento ed identificazione del germe, che con la eventuale valutazione di marcatori di patogenicità o sfruttando la associazione con certi tipi sierologici può dare una indicazione sulla patogenicità dell'agente.

La tossinogenicità può venire determinata fenotipicamente tramite metodi biologici o immunologici, oppure genotipicamente andando a valutare la presenza dei determinanti genici.

Il metodo biologico classico di ricerca di tossine su animali è stato sostituito dall'impiego di colture cellulari, dove l'effetto caratteristico, eventualmente unito alla neutralizzazione con antitossina specifica identifica la presenza di tossina; tale saggio è generalmente ritenuto il test di riferimento. Ma in linea di massima l'impiego di colture cellulari è difficilmente proponibile nei laboratori diagnostici, specialmente di batteriologia, che invece fanno sempre più uso di test immunologici, largamente disponibili commercial-

mente; mentre più a livello di ricerca si impiegano test genetici.

Secondo il metodo tradizionale, la tossinogenicità viene valutata sul ceppo isolato, allungando così i tempi di risposta. Va però ricordato che, quasi come regola, si ritrova tossina libera nelle feci, per cui la messa in evidenza ed identificazione della tossina specifica direttamente nel campione fecale rappresenta l'approccio più diretto per determinare il ruolo del microrganismo.

I diversi approcci e metodi diagnostici verranno discussi e focalizzati in relazione alla diagnosi delle infezioni da *Clostridium difficile* ed alla ricerca dei ceppi di *Escherichia coli* enteromorragici EHEC.

CP.6

DIAGNOSTICA DELLE GASTROENTERITI VIRALI

Cermelli C.

*Dipartimento di Scienze Igienistiche,
Microbiologiche e Biostatistiche,
Università di Modena e Reggio Emilia*

Le gastroenteriti virali rappresentano una delle più frequenti cause di ricovero ospedaliero in età pediatrica e anche, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, una significativa causa di mortalità. I rotavirus sono gli agenti eziologici più frequentemente coinvolti, rendendosi responsabili, in bambini al di sotto dei 5 anni, di circa 500.000 decessi in tutto il mondo ogni anno. Altri agenti importanti coinvolti sono calicivirus (la causa più frequente negli adulti), astrovirus, adenovirus enterici. Infine, in questi ultimi anni, stanno emergendo nuovi virus come possibili agenti eziologici di gastroenteriti, tra cui torovirus, altri coronavirus non-torovirus, pestivirus, picobirnavirus, picotrinnavirus, echovirus 22. Considerando l'importanza della patologia e la grande varietà sempre in espansione di agenti eziologici implicati, la diagnosi di questo tipo di infezione rappresenta un problema importante. Accanto alle metodiche classiche di isolamento virale, di microscopia elettronica e di immunoenzimatica per la ricerca degli antigeni virali, si vanno sempre più affermando tecniche di biologia molecolare che non solo si dimostrano spesso le più sensibili e veloci, ma consentono, in alcuni casi, la simultanea ricerca di molti tipi diversi di virus e la loro tipizzazione (sempre molto utile da un punto di vista epidemiologico), oltre ad essere indispensabili per la diagnostica dei calicivirus che non sono coltivabili *in vitro*. Viene presentata una rassegna delle più usate metodiche diagnostiche per i virus enterici, nonché una revisione critica sulle più recenti acquisizioni nel campo della diagnostica molecolare.

CP.7

LA DIAGNOSTICA PARASSITOLOGICA

Orsi A.

A.O. Careggi, Lab. Microbiologia e Virologia, Firenze

Diversi fattori hanno determinato negli ultimi venti anni un aumentato interesse per la parassitologia.

La facilità di spostamento da una parte all'altra del globo terrestre ed il conseguente aumento dei viaggi ha reso la terra un posto molto piccolo. E' così aumentata per i viaggiatori la possibilità di esposizione a parassiti non endemici nei luoghi di residenza ed anche la possibilità di trasmetterli ad altri individui.

Ne deriva la necessità di ottenere una anamnesi completa dei pazienti e la conoscenza dei parassiti che possono essere presenti in una data area geografica.

I flussi migratori da sud a nord e da est ad ovest, sempre più numerosi negli ultimi anni, hanno determinato la necessità di prendere in considerazione nella diagnosi di infezioni gastroenteriche parassiti che non erano presenti nelle nostre aree geografiche.

Infine l'aumento dei pazienti con disordini del sistema immunitario (aids, trapianti di organi, terapie immunosoppressive) ha determinato la comparsa di infezioni da parassiti "opportunisti" come *Microsporidi*, *Cryptosporidi* e *Cyclospora*.

La diagnosi corretta delle parassitosi intestinali dipende da un certo numero di procedure che, se non correttamente eseguite, può inficiare l'esito della ricerca. La positività dell'esame dipende sia dalla preparazione del paziente che dalle modalità di raccolta, conservazione e trasporto dei campioni.

Fattori influenzanti l'esame parassitologico sono costituiti dal numero di campioni esaminato, dai metodi utilizzati e, non ultimo, dalla esperienza del personale addetto alla lettura dei preparati microscopici.

La ricerca dei parassiti intestinali con metodi tradizionali si basa sull'esame macroscopico e microscopico delle feci. Il primo, fornendo indicazioni generali sulle caratteristiche organolettiche del campione, può aiutare sulla scelta dei metodi diagnostici e permette soprattutto il rilievo di Elminti.

L'esame microscopico può essere eseguito a fresco direttamente o dopo concentrazione delle feci e dopo colorazione permanente. L'esame microscopico diretto è meno sensibile e meno specifico di quello eseguito utilizzando tecniche di concentrazione fecale. Tuttavia anche dopo concentrazione non sempre è possibile eseguire diagnosi di specie. L'uso di colorazioni permanenti è reso necessario sia per migliorare la diagnosi di specie sia perché alcuni protozoi sono difficilmente riconoscibili in preparati a fresco.

La diagnosi sierologica di parassitosi intestinali si avvale da molti anni di vari metodi per il rilievo di anticorpi specifici tuttavia non è molto utilizzata per

motivi di sensibilità, specificità e di difficile interpretazione soprattutto in pazienti residenti in zone endemiche.

Diagnosi parassitologiche alternative sono costituite dalla ricerca di antigeni nelle feci sia con metodi immunoenzimatici che con metodi rapidi immunocromatografici. In alcuni casi (amebiasi) la ricerca degli antigeni specifici con anticorpi monoclonali rappresenta un metodo diagnostico importante per la determinazione di specie. I tests attualmente in commercio per la ricerca di antigeni parassitari nelle feci mostrano eccellente sensibilità e specificità in confronto ai metodi microscopici.

L'introduzione di test diagnostici basati sulla biologia molecolare ha lo scopo di aumentare la sensibilità e la specificità nella diagnosi parassitologica. Gli studi condotti, soprattutto per la diagnosi di amebiasi, dimostrano che tali metodi diventeranno il "gold standard" con il quale altre tecniche diagnostiche dovranno confrontarsi. Non bisogna tuttavia dimenticare che le metodiche basate su PCR oltre che essere costose sono soggette a contaminazioni e possono fornire risultati falsi negativi per la presenza di inibitori della DNA-polimerasi presenti nei campioni fecali.

CP.8

ESPERIENZA DIAGNOSTICA ED ASPETTI EPIDEMIOLOGICI IN UNA GROSSA REALTÀ OSPEDALIERA

Pecile P., Fontanelli A.

A.O. Careggi, Lab. Microbiologia e Virologia, Firenze

Il numero dei microrganismi implicati nella patologia gastroenterica è particolarmente elevato e molto spesso l'agente etiologico rimane sconosciuto. Sicuramente un'anamnesi accurata potrebbe fornire utili indizi circa il microrganismo implicato (condizioni di rischio del paziente, eventuale assunzione di farmaci antimicrobici, sintomatologia predominante, caratteristiche delle feci ecc.) ma, nonostante questo, la richiesta che normalmente perviene al Laboratorio di Microbiologia è quella generica di coprocultura, esame parassitologico e ricerca di virus enteritogeni (*Rotavirus* e/o *Adenovirus* ecc.). Da un'indagine epidemiologica retrospettiva effettuata sui dati relativi ai campioni esaminati nel nostro laboratorio negli ultimi venti anni è apparso che non c'è stata una variazione significativa nelle percentuali di positività relative ai germi enteropatogeni più comuni dagli anni '90 in poi. Nel 1991 la *Salmonella* veniva isolata con una frequenza del 3,5 % contro un 3,3 % del 2003, il *Campylobacter* con una frequenza del 2,8% verso un 2,7% del 2003, la *Yersinia* è passata dallo 0,1% allo 0,8 % e la *Shigella* dallo 0,1% allo 0,3% nel 2003. Inoltre

dal 1986 ad oggi nei campioni positivi non appare cambiato il pattern di isolamento nel senso che *Salmonella spp.* rimane la specie maggiormente isolata (65 % nel 1986 e 55 % nel 2003) seguita da *Campylobacter spp.* (26 % nel 1986 e 39% nel 2003) e poi da *Yersinia enterocolitica* (8 % nel 1986 e 1 % nel 2003) e *Shigella spp.* (1% nel 1986 e 5 % nel 2003). Nel corso di questi anni abbiamo anche voluto verificare quale ruolo avessero altri enteropatogeni segnalati in letteratura. Dal gennaio 1990 al primo semestre del 1994 abbiamo ricercato routinariamente l'*E.coli* O 157 H7, indipendentemente dal tipo di richiesta, sia nei pazienti ospedalizzati che in quelli ambulatoriali. Su un totale di 29.267 coproculture abbiamo isolato 6 ceppi di *E.coli* sorbitolo negativi appartenenti al gruppo sierologico O 157 H7 (pari ad una percentuale di isolamento dello 0.02%), ma, tra questi, solo un ceppo è risultato produttore di verocitotossina con un titolo anticorpale nel paziente di 1:2560 (pari ad una percentuale di isolamento dello 0,003%). Sempre nell'ottica di valutare la circolazione degli enteropatogeni nella nostra area geografica, dal 1993 al 1998 è stata estesa la ricerca routinaria della *Yersinia spp.* a tutte le coproculture pervenute al laboratorio non rilevando comunque variazioni sensibili nelle percentuali di positività che si sono sempre aggirate intorno all'1%.

Per verificare che questo potesse essere legato ad una scarsa sensibilità dell'esame colturale diretto nel 1993 su tutti i campioni pervenuti (6940) è stato anche allestito un arricchimento che non ha comunque portato ad aumenti di isolati di *Yersinia*. Sulla base quindi dei dati epidemiologici locali (ed anche in relazione alla applicazione del nuovo nomenclatore regionale), dal 1998 eseguiamo di routine, su tutti i campioni con richiesta aspecifica di coprocultura, la ricerca di *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter* ed eseguiamo la ricerca degli altri enteropatogeni solo su richiesta specifica.

Nella nostra esperienza è emerso come l'esame microscopico non sia in grado di apportare un aiuto significativo inteso come capacità di aumentare il rilievo dei patogeni rispetto al solo esame colturale. La colorazione di Gram non è discriminante fra patogeni e normali residenti e non sempre nelle campylobatteriosi è evidente la presenza di bacilli Gram negativi a virgola o ad ala di gabbiano; la ricerca dei leucociti fecali potrebbe essere indicativa nelle infezioni batteriche da germi a capacità invasiva (*E.coli* invasivi, *Shigella*, *Salmonella*, spesso *C.difficile*), ma risulta comunque negativa nelle diarreie da germi enterotossici e nei portatori di *Salmonella*.

Una media dell'1-2% di positività, per altro in accordo anche con dati di altri paesi industrializzati, si traduce in un enorme aumento dei costi delle colture positive che probabilmente potrebbe essere abbattuto grazie ad una maggiore appropriatezza della richiesta ricordando ancora una volta la necessità di una stretta collaborazione tra laboratorio, medico ospedaliero e medico di medicina di base.

CP.9**IL CAMPIONAMENTO:
DALLA FORMULAZIONE DELLA
RICHIESTA ALLA RACCOLTA DEL
CAMPIONE****Pozzi L.***Laboratorio di Microbiologia - Az. S. Maria Nuova -
Reggio Emilia*

Il corretto campionamento (per qualsiasi tipo di materiale) rappresenta il primo requisito di qualità ed appropriatezza in Microbiologia.

Le infezioni che riguardano il tratto gastro-intestinale possono essere distinte, in base al tipo di sintomatologia, in infezioni provenienti dall'alto tratto gastrointestinale e infezioni provenienti dal basso tratto gastrointestinale.

Per i sintomi di infezione del più alto tratto intestinale, i campioni in genere raccolti sono:

(1) Biopsie gastriche e duodenali; (2) Lavaggio gastrico; (3) Vomito; (4) Feci.

Per i sintomi di infezione del più basso tratto intestinale, i campioni solitamente raccolti sono:

(1) Feci; (2) Tampone rettale; (3) Biopsie, (4) Scotch.

Per ciascuno di questi materiali, al fine di ricercare i diversi patogeni, è possibile impiegare approcci metodologici differenti, spesso in combinazione fra loro:

- Indagini microscopiche;
- Indagini culturali;
- Indagini immunometriche (sierologia, agglutinationi, immunocromatografia);
- Indagini di biologia molecolare.

L'approccio metodologico è fondamentale al fine del risultato, inoltre per la corretta esecuzione di ciascun tipo delle indagini sopra elencate è importante l'idoneità del campione (e quindi una corretta fase preanalitica).

Il campione del paziente va raccolto in un contenitore idoneo, sulla base della prescrizione del medico. I campioni devono essere trasportati in laboratorio senza danni, evitando problemi di tipo meccanico, termico o di ritardo. Il trasporto dei campioni deve, quindi, avvenire in tempi e condizioni che non alterino le caratteristiche microbiologiche del materiale patologico.

Nell'accettare un campione il laboratorio da per assunto che il campione sia "identico" a quello raccolto dal paziente e pertanto rappresentativo della situazione fisiopatologica. Se non è possibile processare immediatamente il campione occorre prevederne la conservazione in attesa di processo.

Su un campione di feci è possibile effettuare ricerche standard o ricerche mirate. Con le prime si ricercano solitamente Salmonelle, Shigelle e Campylobacter. Per questo tipo di ricerca le feci devono essere raccolte in

un contenitore pulito, non necessariamente sterile e chiuso ermeticamente, con un tappo a vite, non deve essere presente contaminazione (urine etc.). Mediante ricerche mirate (sulla base della prescrizione medica), è possibile determinare la presenza di: *S. aureo*, *E. coli* (entero-emorragici, enteroinvasivi etc), *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *B. cereus*, *H. pylori*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Yersinia*, Vibrieri, Micobatteri, Miceti, Parassiti, Virus.

Queste ricerche necessitano metodi di raccolta e conservazione (oltre che di indagine) che possono essere diversi fra loro.

Nella pratica quotidiana, non è possibile eseguire le numerose e complesse indagini per evidenziare tutti i possibili patogeni intestinali, è quindi necessario che il microbiologo riceva dal Medico curante tutte le informazioni cliniche ed epidemiologiche, che consentano di indirizzare l'indagine verso i patogeni più probabili. La scelta di una tecnica di indagine rispetto ad un'altra o di una loro associazione è fatta sulla base dell'indicazione del curante, che orienta le indagini. Le informazioni da parte del medico curante, che indirizzano verso una od un'altra strategia diagnostica, sono per lo più riportate nel "modulo di richiesta", che giunge al laboratorio assieme al campione da analizzare (o possono essere inserite sul sistema informativo del laboratorio).

Tali informazioni sono principalmente le seguenti:

- Dati anagrafici del paziente, reparto di provenienza e data della richiesta;
- Data di ricovero del paziente;
- Eventuale terapia antibiotica in atto;
- Tipo di materiale inviato, metodo di raccolta, sede del prelievo;
- Indicazione del sanitario che ha richiesto l'esame e riferimento telefonico.
- Sintomatologia: tipo (es. febbre, diarrea), durata, decorso (acuto o cronico).
- Stati di deficit immunitari, recenti viaggi all'estero, presenza di altri pazienti nello stesso nucleo familiare o comunità con sintomatologia analoga.

Quando un campione giunge al laboratorio è necessario stabilire la sua appropriatezza prima della sua processazione.

Per essere considerato appropriato un campione deve possedere alcuni requisiti:

- Pervenire al laboratorio in tempi utili all'esecuzione del tipo di esame necessario;
- Corrispondenza fra i dati riportati sul campione e quelli presenti sul modulo di richiesta;
- Quantità sufficiente per l'effettuazione dell'esame;
- Impiego di un contenitore appropriato, ben chiuso e privo di crepe o segni di rottura (con o senza conservanti, fissativi o terreni di trasporto a seconda del tipo di esame);
- Materiale rappresentativo del processo infettivo sospettato dal clinico.

CP.10**L' ESECUZIONE DEGLI ESAMI:
METODI CONVENZIONALI
ED AUTOMATIZZATI****Massai M.**

Quando un campione di feci giunge in laboratorio è importante accertarsi in primo luogo della sua idoneità sia per ciò che riguarda l'anagrafica sia per il tipo di contenitore utilizzato per la conservazione e il trasporto del materiale in esame, ed infine della sua integrità. Bisogna verificare che il campione sia in quantità sufficiente per consentire l'esecuzione dell'esame ma non troppo abbondante per non creare rischio di fuoriuscita al momento della apertura, non deve inoltre essere contaminato da urine o da altri liquidi che, modificando il pH, riducono la possibilità di sopravvivenza di alcuni patogeni; infine è importante verificare la congruità e appropriatezza della richiesta ricorrendo, quando è necessario, al colloquio con il clinico per i necessari chiarimenti.

L'esame microbiologico delle feci non differisce da quello di altri materiali biologici, richiede quindi l'applicazione di alcune fondamentali norme di sicurezza (ad es. l'utilizzo di cappe a flusso laminare, l'uso idoneo di guanti a perdere) come ampiamente previsto dalla normativa vigente e di alcuni principi di ergonomia come una giusta organizzazione del banco di lavoro, una corretta illuminazione ed il mantenimento di una idonea postura, piccoli accorgimenti che consentono una migliore produttività con un più basso dispendio energetico.

Per la diagnosi delle enteriti acute batteriche l'esame di routine è rappresentato dalla coprocultura cioè la semina delle feci - fresche o conservate in idoneo terreno di trasporto - su terreni selettivi che consentono una prima identificazione presuntiva di colonie sospette. Saranno descritti l'iter diagnostico per i principali patogeni, la tecnica di semina, le precauzioni per il contenimento del rischio biologico e chimico, i principali terreni tradizionali e brodi di arricchimento in uso nel nostro laboratorio ed i principali disponibili in commercio nonché alcuni terreni cromogenici da utilizzare a fianco o in sostituzione dei terreni tradizionali. Da ricordare anche la possibile utilità di un esame microscopico che talora può dare informazioni tempestive circa la presenza di alcuni patogeni con morfologia tipica o di una forte presenza di leucociti come segno di una forma di tipo invasiva. Il nostro protocollo, in accordo con la epidemiologia del territorio e con il nomenclatore regionale, prevede la ricerca routinaria per coprocultura di *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e di *Campylobacter* spp., ma su richiesta del clinico l'indagine si può estendere ad altri patogeni meno frequenti come *E. coli* (EPEC, VTEC; ecc.), *Y. enterocolitica*,

Aeromonas e *Plesiomonas* spp., *Vibrionaceae* ecc. In caso di forme diarroiche in pazienti ospedalizzati viene accertata di routine la responsabilità del *Clostridium difficile* ed altri patogeni sempre su specifica richiesta del medico curante. In caso di eventi epidemici in corso di tossinfezione alimentare, dietro segnalazione del servizio di igiene pubblica, allarghiamo la ricerca anche agli altri microrganismi possibilmente coinvolti come *C. Perfringens*, *B. cereus* ecc.

Attualmente è disponibile in commercio un sistema (Robobact) per la semina in automatico dei materiali biologici applicabile ad una routine tipica di un laboratorio di microbiologia clinica. Questo sistema consente di effettuare la semina del materiale senza aprire i contenitori di raccolta previa coltura di arricchimento in brodo; lo strumento è costituito da una parte strumentale - moduli di semina ed incubazione con atmosfera normale o modificata (microaerofilia) - e da vari set sia di raccolta che di semina diversi a seconda dell'indagine microbiologica da eseguire. Il sistema consente una ampia scelta di terreni di trasporto, arricchimento e selettivi ed una altrettanto ampia gamma di terreni agarizzati. Fa parte dello strumento anche un modulo di gestione che può essere collegato al sistema informatizzato del laboratorio ciò consente di effettuare direttamente sia il check-in che l'immissione dei risultati. Verrà descritta la nostra esperienza con questo sistema con prove effettuate in doppio con il metodo tradizionale di semina e verranno riportati anche i risultati preliminari di prove da noi effettuate con Robobact nel corso di uno studio multicentrico dove il sistema risultò valido come performance microbiologica (capacità e qualità della semina), sicurezza e facilità d'uso ma dove si evidenziò la necessità di ottimizzare la fase di arricchimento in brodo per evitare false negatività nei campioni con una bassa concentrazione dei microrganismi patogeni.

Verranno illustrate e commentate da un punto di vista pratico e con particolare riguardo anche alle precauzioni di contenimento biologico e chimico, anche le tecniche più utilizzate nei laboratori di grossa routine per la diagnostica delle infezioni da virus enteritogeni e per le forme di parassitosi intestinali. Principalmente verranno presi in considerazione metodi che si basano su test al lattice, test immunoenzimatici ed immunocromatografici per la diagnostica virale e quelli microscopici con arricchimento, immunoenzimatici ed immunocromatografici, per la diagnostica parassitologia.

relazioni

SESSIONE I

Le epidemie nosocomiali

Mercoledì 9 Giugno 2004, 9.00-13.00 Sala D

S1.2

RUOLO DELLA MICROBIOLOGIA TRADIZIONALE

Vaiani R.

Microbiologia, Ospedale "A. Manzoni", Lecco

Nella gestione delle epidemie il Laboratorio di Microbiologia può avere funzioni diverse: a) Rilevare per primo (in alternativa al clinico) l'insorgenza di una epidemia. b) Informare tempestivamente il CIO che, con clinico e microbiologo, deve rivedere criticamente i dati partendo dalla definizione di caso per evidenziare tutti i possibili soggetti coinvolti. c) valutare gli isolati per capire se vi è la possibilità/probabilità che ci si trovi di fronte ad un clone o a microrganismi diversi. d) Confermare che gli isolati in esame appartengono o meno allo stesso clone utilizzando metodiche di biologia molecolare; queste metodiche non possono essere effettuate in tutti i Laboratori.

Il ruolo della microbiologia tradizionale riguarda i punti a) e c), i cui aspetti chiave sono: 1) come leggere i dati di laboratorio per evidenziare più facilmente un eventuale cluster epidemico; 2) quali ceppi conservare e come conservarli per le indagini successive; 3) quale è la capacità discriminante dei metodi di uso routinario; 4) come collaborare all'indagine epidemiologica.

I dati di laboratorio sono di facile lettura quando vi sono batteri con marker particolari o presenti in situazioni fuori norma; per questo vanno rilevati ed archiviati i dati che permettono queste osservazioni. I metodi di laboratorio di uso routinario per la discriminazione di un ceppo batterico da altri della stessa specie servono per una prima selezione dei ceppi da indagare più a fondo. Questi metodi consistono essenzialmente nella comparazione dei test di identificazione, nella valutazione delle resistenze alle diverse classi antibiotiche e nella tipizzazione sierologica. Da ultimo il

laboratorio tradizionale è fondamentale nella ricerca delle fonti di infezione, ricerca che rientra nell'indagine epidemiologica che il CIO è tenuto ad avviare per avere la piena comprensione di come è avvenuta l'epidemia ed eseguire interventi mirati nel caso di eventuale bonifica terminale.

S1.3

RUOLO DEL GRUPPO OPERATIVO DEL CCIO

Pellegata G., Viganò E.F.

Azienda Ospedaliera di Legnano

Introduzione:

Premessa indispensabile affinché il CCIO abbia un ruolo nella gestione delle epidemie ospedaliere è che esista un'organizzazione, pre-esistente l'evento epidemico, per la prevenzione ed il controllo delle I.O.

L'esistenza o meno di tale organizzazione, la cui operatività dovrà essere garantita dal CCIO, condiziona pesantemente la gestione di una futura epidemia, anche seguendo dettagliatamente le più accreditate linee guida.

L'attuale contesto normativo e legislativo regionale e nazionale (es. Piani sanitari regionali e nazionale) offre delle opportunità per l'implementazione o la realizzazione locale di programmi di prevenzione. In alcuni contesti regionali (es. Lombardia e Piemonte) gli obiettivi di interesse regionale dei Direttori Generali delle A.O. ed i vincoli di accreditamento delle strutture sanitarie indirizzano verso una sempre maggiore operatività nell'ambito della prevenzione e controllo delle I.O.

Il ruolo del CCIO e del Gruppo operativo:

Il CCIO, strumento di integrazione di risorse esistenti in azienda, alla luce di quanto esposto in premessa

dovrà ricevere dalla Direzione strategica un chiaro mandato operativo. Dovranno essere definiti con precisione, nell'ambito dei programmi di prevenzione e controllo delle I.O., **l'organizzazione di una struttura operativa** (Gruppo operativo o Servizio dotato di propria autonomia) con dettaglio degli obiettivi, personale dedicato/coinvolto, strumenti ed un **sistema di sorveglianza** (dal laboratorio di Microbiologia) definendo cosa, come e chi sorvegliare, un sistema di allerta rapido (microorganismi sentinella e relative procedure).

La procedura di definizione di un'epidemia dovrà essere condivisa e dovrà prevedere le specifiche azioni da porre in essere e le autorità che dovranno disporle. Dovranno essere previste le ricadute delle singole azioni (es. costi di sanificazioni straordinarie, assegnazioni straordinarie di personale, variazioni di percorsi interni, contatti con i mass-media ecc.).

Gli interventi in caso di epidemia nosocomiale possono essere così riassunti: identificazione dell'epidemia, definizione di pseudo-epidemia, definizione di caso e verifica dei dati, definizione di focolaio epidemico, individuazione delle cause, protocolli di intervento.

S1.4

L'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE: METODI E LIMITI

Dicuonzo G.

Servizio Microbiologia, Campus Biomedico, Roma

Il sospetto di un'epidemia in atto in un ospedale richiede tra le altre misure la raccolta dei ceppi incriminati e la dimostrazione che questi costituiscono effettivamente un "clone".

Preliminarmente occorre che i ceppi della specie incriminata vengano effettivamente identificati, in genere con metodi fenotipici, come appartenenti alla specie di interesse.

Per i batteri, d'altra parte, una "specie" è stata definita sulla base di una forma primitiva di genotipizzazione, in quanto si dice che ceppi appartengano alla stessa specie quando abbiamo un valore di omologia DNA-DNA ³ 70%.

E' stato sottolineato che occorre usare sia multipli metodi fenotipici affermati che esplorino varie caratteristiche metaboliche, antigeniche, morfologiche, biochimiche della specie, sia anche metodi che esplorino alcune caratteristiche dei genomi, per definire in maniera accettabile le specie in ambito batteriologico. Si va quindi affermando il concetto di un approccio multifasico alla stessa definizione delle specie. Questo atteggiamento era stato preceduto dalla tassonomia numerica, che può riavere un ruolo sempre più importante per correlare caratteristiche fenotipiche e caratte-

ristiche genomiche, specie con le disponibilità computazionali, anche a livello di desktop, che si possono ottenere con i moderni hardware dei computer da tavolo con varie piattaforme (Windows, Macintosh, Linux, UNIX).

L'epidemia o l'endemia in atto vengono definite solo quando i ceppi della stessa specie isolati in vari individui (malati o portatori sani) in vari tempi si rivelano appartenere allo stesso "clone".- E' quindi cruciale definire un "clone".

Un clone od un gruppo clonale di isolati (o ceppi) è compreso dai ceppi che discendono da un ceppo comune originante (common ancestor).

A questo punto è necessaria una definizione operativa di clone (o cloni appartenenti allo stesso gruppo clonale): esso richiede una definizione di parentela adeguatamente dimostrata attraverso tecniche le quali usino dei markers genetici di sufficiente potere discriminatorio.

Non esiste una metodica che possa essere definita come sufficientemente discriminatoria nei confronti di tutte le specie di interesse (clinico o epidemiologico o tassonomico).

E' necessario inoltre prendere in considerazione anche la semplicità d'uso della metodica, la sua riproducibilità intra ed interlaboratori, la sua portabilità(usabilità tra vari laboratori e trasmissione dei dati da laboratori a laboratori con metodi web-based).

Inoltre altro è identificare cloni a larga diffusione geografica che servono a disegnare il percorso nel tempo e nello spazio di determinati cloni (per esempio i cloni MRSA), od anche a definire gli avvenimenti di particolari fenomeni che hanno dato luogo al passaggio di materiale genetico importante (per esempio il timing del passaggio di SSC, la cassetta contenente il gene di resistenza alla meticillina, dal supposto stafilococco coagulasi negativo resistente al primo *S. aureus*, ed i passaggi o perdite successive). Altro è invece identificare l'evolversi di un ceppo in un'epidemia ospedaliera, in cui occorre avvalersi di markers che rivelino anche sottili eventi evolutivi del ceppo.

Quindi non si possono dare consigli generali, anche se è certo che il primo vero metodo per la definizione di cloni, la Multilocus Enzyme Electrophoresis di Selander rimane una pietra miliare e rimane insuperata se non dalla sua versione genomica attuale proposta da alcuni anni dal gruppo di Spratt, cioè la Multi Locus Sequence Typing : queste due metodiche sembrano costituiscano ormai metodi di riferimento insostituibili nella definizione dei cloni a larga diffusione geografica o temporale.

La Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ha una lunga ed onorata storia d'uso e larghi meriti nella definizione di cloni sia di Gram positivi che di Gram negativi: essa soffre di una notevole difficoltà di riproducibilità e portabilità, solo in parte risolta da metodi di rilevamento e digitalizzazione automatici, nonché dall'uso di algoritmi di calcolo delle relazioni tra ceppi,

com'è in diversi softwares come il Bionumerics ed altri.

I metodi basati sulla PCR, che sarebbe troppo lungo elencare in una presentazione riassunta sono molto attraenti perché in linea di principio più semplici dei precedenti e portabili: in genere ognuno ha i suoi meriti ed in genere alcuni si adattano meglio ad alcune specie e non ad altre.

Molto dipende dal tipo di target dei primers, ed alcuni anche dalla complessità degli adattatori che si usano.

Si può pensare che il metodo ideale dovrebbe avere dei target particolari con zone ripetitive, al prodotto della cui amplificazione si possa applicare metodiche di sequenziamento o di restrizione che permettono una identificazione univoca del clone.

Il più delle volte occorre unire PFGE e PCR per vari target sottoposti a sequenziamento o restrizione per ottenere con un metodo a cascata un sistema esauriente, ma anche il più economico possibile, di identificazione di un clone.

S1.5

ESPERIENZE NELLA GESTIONE DI EPIDEMIE NOSOCOMIALI: OSPEDALE S. G. BATTISTA DI TORINO

Serra R., Fossati L., Marchiaro G.

SCDO Microbiologia ASO S.G. Battista - Torino

Gli eventi epidemici, in ospedale, pur riconoscendo diverse concause (multifattorialità, comune agli eventi infettivi di carattere nosocomiale) sono per lo più sostenuti da un unico agente eziologico; in qualche caso tuttavia vi può essere pluralità di agenti eziologici (es. infezioni della ferita chirurgica o delle vie urinarie associate a cateterismo vescicale sostenute da microrganismi diversi, quale espressione di gravi carenze sul piano igienico-assistenziale). Inoltre tali eventi possono non essere percepiti come clinicamente manifesti, bensì presentarsi sotto forma di colonizzazione o sieroconversione, entrambe silenti.

Viene riportata l'esperienza del Servizio di Sorveglianza Microbiologica delle Infezioni (SSMI) che fa capo alla SCDO Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino in tema di sorveglianza e controllo delle epidemie maturata in un grande ospedale regionale di circa 1400 posti letto, con oltre 35.000 ricoveri anno, sede di istituti universitari, di unità di trapianto di organi e centro di rilevanza nazionale per il case mix. Gli eventi epidemici osservati sono in gran parte riconducibili a quattro tipologie principali.

Eventi che hanno ormai da tempo assunto un carattere endemico, ma che sporadicamente manifestano rilievo epidemico.

Le infezioni sostenute da MRSA sono tradizionalmente prevalenti nelle unità di terapia intensiva, in cui la percentuale di pazienti colonizzati è costantemente elevata e rappresenta il serbatoio più rilevante di infezioni, veicolate per lo più dalle mani del personale. Il SSMI ha messo a punto un dispositivo di sorveglianza basato sulla rilevazione sistematica del numero di eventi (pazienti con almeno un isolamento di ceppi MRSA da campioni ritenuti rappresentativi): la segnalazione di possibile evento epidemico viene comunicata al personale addetto al controllo delle infezioni (ICI) quando il numero di casi registrati nella frame temporale considerata (settimana corrente) è significativamente superiore al valore medio calcolato per quella frame, continuamente aggiornato e rilevato su un periodo storico di dodici mesi.

Il controllo dell'endemia è da sempre problematico per la scarsa compliance del personale a rispettare le misure di barriera più efficaci, complici le croniche carenze dell'organico e delle strutture, che non consentono efficaci misure di isolamento, oltre alla pressione selettiva dovuta all'impiego massiccio di antibiotici. È stata avviata di recente un'esperienza pilota in due unità di terapia intensiva che prevede lo screening per MRSA dei pazienti all'ingresso, l'isolamento contumacia, l'eventuale bonifica con mupirocina, e culture di sorveglianza settimanali dei ricoverati.

Eventi epidemici di origine esclusivamente ambientale. Si tratta di infezioni sostenute da patogeni non trasmissibili mediante contagio interumano, ma che possono coinvolgere aree più o meno vaste dell'ospedale in relazione al grado di contaminazione ambientale. Gli episodi di legionellosi che pochi anni prima hanno fatto registrare una incidenza relativamente elevata, sono stati efficacemente (anche se non del tutto) controllati mediante clorazione continua della rete idrica; il livello di sorveglianza viene tuttavia mantenuto elevato (ricerca sistematica dell'antigene urinario in tutti i casi di polmonite).

Attualmente trascurabile, anche nei reparti a rischio, il numero di casi di aspergillosi invasiva, probabilmente per effetto delle rigorose (e costose) misure di prevenzione adottate nei numerosi cantieri, sempre aperti in un ospedale che ha più di 60 anni, e della movimentazione dei pazienti.

È stata di recente osservata una epidemia di sepsi da contaminazione di soluzioni per infusione parenterale: l'evento è stato tempestivamente riconosciuto data anche la relativa rarità dell'agente eziologico identificato (*R. pickettii*).

Il riscontro del medesimo ceppo in emocolture di pazienti ricoverati in reparti diversi dell'ospedale, in un primo tempo è stato attribuito a contaminazione dei dispositivi per emocoltura (evento pseudoepidemico già segnalato in letteratura); esclusa tale eventualità, l'indagine epidemiologica ha in seguito ipotizzato la possibile sorgente dell'infezioni in una partita di fiale di eparina somministrata ai pazienti: anche se culture

random dei campioni sospetti sono state negative, dopo l'eliminazione del lotto incriminato, non sono stati registrati altri casi di sepsi.

Eventi epidemici di origine ambientale e umana sostenuti da agenti eziologici a elevata patogenicità

I casi di infezione da enterobatteri del gruppo KES e/o produttori di ESBL, spesso gravi, non hanno quasi mai assunto carattere epidemico.

Il riconoscimento e la tempestiva segnalazione degli isolati e le misure di controllo (isolamento da contatto), si sono dimostrate generalmente efficaci.

Di recente è stata descritta in una unità critica un cluster (3 casi) sostenuto da un ceppo di A. baumannii MDR, evento che ha avuto risonanza nazionale sui media, in concomitanza con i casi segnalati in alcuni ospedali francesi e associati a un certo numero di decessi.

Il ceppo è verosimilmente stato introdotto da un paziente proveniente da una unità di terapia intensiva di un ospedale piemontese (in precedenza, nel ns. ospedale, non erano mai stati descritti isolamenti di ceppi di *Acinetobacter spp.* MDR).

La segnalazione tempestiva dell'isolato (compreso nell'elenco degli "alert organisms", oggetto di monitoraggio costante da parte della Microbiologia) ha permesso di isolare il paziente e i casi secondari, dovuti probabilmente a contagio interumano attraverso le mani del personale: la ricerca di portatori (identificati mediante colture rettali, come raccomandato dalla letteratura per casi analoghi) è risultata negativa, mentre il riscontro di un elevato livello di contaminazione ambientale ha giustificato la temporanea chiusura del reparto per consentire una efficace sanificazione.

Eventi epidemici di origine ambientale e umana sostenuti da agenti eziologici a bassa patogenicità

Nel corso del 2002 si è registrato un deciso incremento dell'isolamento di ceppi VRE, per lo più in alcuni reparti critici che hanno condiviso i medesimi pazienti. La tipizzazione ha dimostrato la prevalenza di genotipi strettamente correlati accanto a ceppi non correlati. Lo screening dei portatori ha permesso di documentare la presenza di pazienti colonizzati al momento del ricovero, fenomeno verosimilmente associato alla circolazione di ceppi di origine animale in comunità e trasmessi con gli alimenti.

Le misure di controllo si sono dimostrate poco efficaci: la massiccia colonizzazione ambientale associata alla circolazione dei VRE, la scarsa sensibilità del personale di assistenza al problema, che ritiene ingiustificate misure restrittive nei confronti di pazienti per lo più asintomatici, hanno contribuito alla diffusione del ceppo a livello endemico.

Anche i casi di diarrea associati a C.difficile dopo un incremento apparente, da attribuire al miglioramento delle tecniche diagnostiche, hanno assunto nell'ultimo triennio, un'incidenza costante (2-3 casi/1000 ricoveri/anno): il decorso clinico è generalmente limitato a episodi di diarrea moderata, anche se le recidive non

sono infrequenti: nessun caso ha presentato di recente il quadro della colite pseudomembranosa.

Gli eventi epidemici sono relativamente rari, pochi i pazienti coinvolti (nonostante la tempestività della segnalazione, pochi casi di trasmissione interumana sono comunque spesso inevitabili, specie tra i pazienti a rischio per età avanzata o pregressa terapia, data l'elevata contagiosità dell'infezione).

Le misure di controllo specifiche (isolamento da contatto) e di carattere generale sono efficaci, mentre la ricerca sistematica o occasionale dei portatori asintomatici non viene ritenuta utile.

Nella ns. esperienza la sorveglianza delle epidemie si basa su un dispositivo di segnalazione tempestiva degli isolamenti di (potenziali) patogeni di rilievo epidemiologico, in quanto agenti di infezioni gravi e/o facilmente trasmissibili e/o indicatori di fenomeni di contaminazione ambientale (alert organisms).

I dati microbiologici sono integrati dalla sorveglianza diretta del personale addetto al controllo delle infezioni che raccoglie sistematicamente e valuta l'attendibilità di segnalazioni estemporanee di eventi inconsueti da parte del personale di reparto.

In caso di probabile evento epidemico, il gruppo operativo del CIO, costituito dal responsabile del controllo infezioni della Direzione sanitaria dell'azienda, dagli ICI e dal referente del SSMI, decide gli ulteriori accertamenti da intraprendere (ricerca attiva di nuovi casi, ricerca di portatori, ricerca di focolai ambientali) sulla base delle caratteristiche dell'evento epidemico (localizzazione dell'infezione, distribuzione spaziotemporale dei casi, fattori di rischio comuni, agente eziologico, dati di letteratura disponibili, ecc.)

Vengono intanto immediatamente attivate le misure di controllo giudicate più idonee in stretta collaborazione con il personale di assistenza coinvolto: isolamento dei pazienti colonizzati/infetti (in caso di possibile trasmissione interumana), sanificazione ambientale e bonifica di eventuali focolai, revisione delle procedure assistenziali.

Nella nostra esperienza la maggior parte dei piccoli cluster si estingue spontaneamente a seguito di questi provvedimenti di carattere generale o per il provvidenziale intervento del ben noto "effetto Hawthorne".

Le moderne tecniche di biologia molecolare si sono rivelate di grande utilità per interpretare gli eventi epidemici, a condizione che vengano impiegate non in modo indiscriminato o sistematico, ma selezionate sulla base dei risultati o delle ipotesi formulate dopo una accurata indagine epidemiologica.

In conclusione l'attività di prevenzione e controllo delle epidemie del SSMI della SC Microbiologia risulta efficace a fronte di un adeguato e corretto utilizzo degli esami microbiologici da parte dei clinici e della stretta (e quotidiana) collaborazione con il personale addetto al controllo delle infezioni della Direzione Sanitaria dell'azienda.

S1.6

ESPERIENZE NELLA GESTIONE DI EPIDEMIE NOSOCOMIALI: IRCCS SAN MATTEO DI PAVIA

Marone P., Carretto E.

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

Gli stafilococchi aurei resistenti alla meticillina (SAMR) sono fra i patogeni più frequentemente isolati nelle Terapie Intensive (TI). Tra il luglio 1998 e il giugno 1999 è stato messo in atto un protocollo di sorveglianza sulle colonizzazioni/infezioni da SAMR presso una delle 3 TI dell'IRCCS Policlinico "San Matteo" di Pavia. Sono stati arruolati nello studio 292 pazienti, 87 dei quali sono risultati colonizzati (29.8%). In 40/87 (13.7%) la colonizzazione era già presente all'ingresso, mentre in 47/87 (18.6%) è avvenuta in TI. Nell'ambito dei pazienti colonizzati, 26/87 (29.8%) hanno sviluppato un'infezione da SAMR. Analisi molecolari (ribotipizzazione con sistema automatico) hanno consentito di stimare dodici differenti cluster di microrganismi, il più numeroso dei quali risultava essere composto da un elevato numero di isolati (146).

Nel periodo compreso fra l'1 gennaio 1997 e il 31 dicembre 2001 è stato condotto uno studio di sorveglianza relativamente agli enterobatteri produttori di beta-lattamasi a spettro allargato (ESBL+) isolati da una TI del nostro ospedale. *P. mirabilis* è risultato il microrganismo che più frequentemente ha mostrato il fenotipo ESBL+ (58%). In 312 casi l'isolamento dell'enterobattere è stato considerato come causa di infezione; nell'ambito dei diversi episodi infettivi, i ceppi ESBL+ sono risultati essere causa di infezioni delle vie urinarie nel 44.9% dei casi, di sepsi nel 30%, di polmoniti nel 25.8%, di infezioni di ferita nel 20.4%. La mortalità complessiva nelle infezioni sostenute da ceppi ESBL+ è risultata essere pari all'1%, contro il 10.6% dei ceppi non produttori. Nel periodo considerato, l'incidenza dei ceppi ESBL+ è andata progressivamente riducendosi, passando dal 38.9% del 1997 al 10.9% del 2001. Questo risultato è stato ottenuto grazie alle misure messe in atto nell'U.O. (precauzioni di barriera, variazioni nella terapia antibiotica empirica ecc.).

Dal giugno 1998, a seguito del primo caso di sepsi da enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) presso il nostro Ospedale, è in atto un protocollo di sorveglianza attiva delle infezioni/colonizzazioni da VRE. Le U.O. coinvolte sono state sinora le 3 TI e l'Oncoematologia Pediatrica, anche se isolamenti sporadici di questo microrganismo sono stati osservati

anche in altri Reparti. Un outbreak di colonizzazioni si è avuto presso una delle TI: a partenza da un caso indice, sei pazienti degli 8 ricoverati sono risultati colonizzati da VRE. Da allora e nei 16 mesi successivi sono stati analizzati i tamponi rettali di 509 pazienti. Di essi 13 (2.5%) sono risultati colonizzati all'ingresso in TI, mentre 43 (8.7%) dei restanti 496 pazienti VRE negativi hanno acquisito il microrganismo durante la degenza in TI. Il fattore di rischio più evidente è risultato essere, nella nostra esperienza, la durata della degenza in TI. Due pazienti hanno sviluppato infezione da VRE; l'indice colonizzazioni/infezioni è quindi risultato essere del 3.6% e la frequenza complessiva delle infezioni da VRE dello 0.4%. Entrambi i pazienti, trattati con oxazolidinoni, sono guariti. Sui diversi ceppi è stata eseguita ribotipizzazione con sistema automatico, utilizzando differenti enzimi di restrizione, che ha consentito di identificare tre differenti cluster: al più numeroso erano ascrivibili 52 pazienti, mentre altri due, uno dei quali causato da ceppi di *E. faecalis* (mentre tutti gli altri erano *E. faecium*), sono risultati essere composti da due pazienti. A seguito del manifestarsi dell'epidemia sono state messe in atto procedure di isolamento e training del personale come indicato nelle procedure dei Centers for Disease Control del 1995. L'incidenza degli isolamenti si è progressivamente ridotta nei mesi successivi, con un caratteristico andamento "a dente di sega" e con mesi liberi da isolamenti a partire dal 16° successivamente all'outbreak iniziale. Peralto il ripresentarsi di nuovi casi sporadici nel reparto di TI sembrerebbe documentare uno stato di endemia a livello del nostro Ospedale, rilevabile più facilmente nelle aree critiche quali le TI che hanno uno scambio continuo di pazienti con altre unità operative.

S1.7

ESPERIENZE NELLA GESTIONE DI EPIDEMIE NOSOCOMIALI: POLICLINICO UNIVERSITARIO DI PARMA

**Menozzi M.G., Bertoncini L., Zerbini L.,
Rossi S., Somenzi P., Chezzi C., Dettori G.**

*Sezione di Microbiologia, Dip. di Patologia e Medicina
di Laboratorio-Univ. degli Studi di Parma*

Clostridium difficile enterotossigenico è responsabile di un ampio spettro di infezioni: una colonizzazione asintomatica, una diarrea autolimitantesi, coliti di varia gravità fino alla colite pseudomembranosa. Rappresenta inoltre la principale causa di diarreie nosocomiali, problema di grande rilevanza socio-economica negli ambienti ospedalieri. La popolazione maggiormente suscettibile alla malattia è rappresentata dai

pazienti anziani; al contrario nei neonati la percentuale di portatori del microrganismo e/o delle sue tossine è alta, con bassa incidenza della malattia. La malattia da infezione associata a *C. difficile* insorge più frequentemente in condizioni di dismicrobismo intestinale a seguito di una terapia antibiotica.

La malattia è causata da ceppi tossinogenici TcdA+B+, generalmente produttori di una enterotossina A, responsabile prevalentemente di una sintomatologia diarroica, e di una citotossina B, che causa danni ai tessuti della mucosa intestinale, inducendo importanti cambiamenti morfologici cellulari. Di recente, studi rivolti a chiarire in particolare le basi molecolari del meccanismo d'azione delle tossine hanno messo in evidenza che nell'ambito di ceppi diversi esiste una eterogeneità nella sequenza dei geni codificanti per le tossine A e B; sono stati inoltre riportati isolamenti di ceppi che producono solamente la citotossina B (TcdA-B+) ed è emerso un nesso eziologico tra questi ceppi e stato di malattia.

Presso la Sezione di Microbiologia-Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio è stato condotto uno studio epidemiologico, che si proponeva di rilevare la effettiva incidenza della malattia intestinale associata a *Clostridium difficile* (CDAD) in una popolazione di pazienti ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera di Parma: in particolare, di stabilire il numero percentuale dei malati e la frequenza dei portatori asintomatici del batterio (possibile sorgente di una sua circolazione nosocomiale), di sorvegliare la comparsa di particolari stipti tossinogenici (TcdA-B+), mettendoli in relazione con le diverse situazioni cliniche e infine di accertare una eventuale diffusione epidemica nosocomiale di ceppi di *C. difficile* in particolare nella popolazione anziana, considerata più a rischio di malattia. Per raggiungere questi obiettivi è stato rivisto il protocollo diagnostico in uso: la diagnosi rapida diretta sul campione fecale, che ricerca simultaneamente la produzione *in vivo* della glutammato-deidrogenasi (GDH) e della tossina A (ToxA) da parte del ceppo di *C. difficile*, è stata completata con la ricerca della citotossina B su colture di cellule Vero e dall'isolamento del ceppo batterico. Quest'ultimo è stato sempre caratterizzato per la sua capacità di produrre o meno la tossina A *in vitro* mediante un sistema immunoenzimatico o immunocromatografico. Inoltre, il protocollo diagnostico è stato ampliato con l'introduzione di metodiche di biologia molecolare: una Duplex PCR per caratterizzare la enterotossinogenicità dei ceppi isolati, verificando contemporaneamente la presenza dei geni codificanti per la enterotossina A (*tcdA*) e la citotossina B (*tcdB*) con l'obiettivo di rilevare la effettiva circolazione dei ceppi TcdA-B+ e la PCR-ribotyping per la tipizzazione a fini epidemiologici degli stessi.

Nello studio epidemiologico prospettico sono stati arruolati 450 pazienti (357 adulti e 93 bambini), ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera di Parma da Novembre 2002 a Novembre 2003, per i quali veniva

posto il quesito diagnostico di confermare attraverso le indagini di laboratorio il sospetto clinico di malattia da infezione associata a *C. difficile*, posto seguendo i criteri stabiliti nel protocollo di studio accettati a livello internazionale. Sono stati pertanto esaminati 513 campioni fecali, dei quali 441 appartenenti ad adulti e 102 a bambini. Contestualmente è stata analizzata una seconda popolazione di 156 pazienti sintomatici, ma il cui caso clinico non era inquadrabile in una CDAD; questa popolazione era costituita da pazienti selezionati in base al Reparto di provenienza ed al periodo del ricovero in modo da coincidere come Degenza e temporalmente con i "casi di sospetta CDAD".

I risultati ottenuti nell'ambito della popolazione complessivamente studiata hanno permesso di affermare che anche nel nostro ambiente la malattia intestinale associata a *C. difficile* rappresenta un problema serio dal punto di vista socio-sanitario in base all'incidenza dei casi di CDAD diagnosticati negli adulti (17,1%) in un confronto con i dati riportati in letteratura. Al contrario, nei bambini si è potuto confermare che lo stato di malattia (6,5%) è meno frequente dello stato di portatore (22,6%). Dall'analisi dettagliata dei dati raccolti, in relazione anche alle patologie di base dei pazienti esaminati ed all'inquadramento degli stessi in base a fasce di età, è stato messo in evidenza che la malattia incide prevalentemente negli anziani (75,4% dei casi positivi). In quest'ambito è stata documentata in alcuni casi clinici la persistenza del ceppo e/o delle sue spore *in vivo* e la sua responsabilità in recidive della malattia diarroica protrattasi anche per alcuni mesi: è stato infatti possibile dimostrare mediante PCR-ribotyping l'isolamento ripetuto dello stesso ceppo di *C. difficile*, appartenente allo stesso ribotipo.

La caratterizzazione molecolare mediante Duplex PCR della enterotossinogenicità di 144 ceppi ha dimostrato che, almeno allo stato attuale, nessuno dei ceppi isolati dai nostri pazienti affetti da CDAD ha mostrato un'alterazione del locus di patogenicità: tutti sono risultati possedere entrambi i geni *tcdA*+/*tcdB*+, in particolare anche quei 23 ceppi risultati o non produttori o comunque scarsamente produttori della tossina A al di sotto del limite di sensibilità del saggio immunocromatografico stesso (TcdA-TcdB+). La maggior parte di questi 23 ceppi è stata isolata da campioni GDH+ToxA-; nella nostra esperienza la ricerca della tossina A nel campione risente del momento del prelievo: il risultato nell'ambito di diversi campioni dello stesso paziente è variabile ed è per questo che la diagnosi di laboratorio si deve basare su almeno due campioni consecutivi raccolti a distanza non ravvicinata. Mediante la ribotipizzazione di 193 ceppi, isolati dal 1993 al 2001 e durante lo studio epidemiologico prospettico (2002-2003), è stato infine messo in evidenza che dei 22 diversi ribotipi riscontrati 6 ribotipi (1, 4a, 3, 2a, 21, 6) sono predominanti e che i ribotipi 1 (32% del totale dei ceppi) e 4a (23,8%), in particolare, rappresentano ceppi endemici nel nostro ambiente espe-

daliero. I risultati ottenuti infine sembrano suggerire una possibile diffusione epidemica nosocomiale di ceppi di *C. difficile*, risultati appartenere prevalentemente ai due ribotipi predominanti 1 e 4a, nella popolazione anziana studiata.

Il quadro epidemiologico emerso motiva l'interesse e l'opportunità di intraprendere una più stretta sorveglianza ai fini di una prevenzione di epidemie nosocomiali di *C. difficile* nel nostro ambiente, che è raggiungibile solo attraverso un rigoroso controllo dei portatori del batterio all'atto del ricovero rispetto a quelli che si colonizzano nel corso della ospedalizzazione così come attraverso un attento controllo del personale e dell'ambiente stesso.

Questa sorveglianza non solo è motivata dai risultati ottenuti, ma è resa fattibile dall'approccio diagnostico tradizionale e molecolare, che è stato messo a punto e validato in questo studio epidemiologico prospettico.

relazioni

SESSIONE 2

Patogeni emergenti (in virologia)

Mercoledì 9 giugno 2004, 9.00 - 13.00 Sala F

S2.1

LA FEBBRE DENGUE: MALATTIA TROPICALE A RAPIDA E GLOBALE PROGRESSIONE?

Anselmi M.

Centro per le malattie tropicali, Ospedale di Negrar (VR)

L'infezione con il virus della Dengue può essere asintomatica, oppure causare una malattia febbrile aspecifica (Dengue Fever o DF), una febbre emorragica (Dengue Haemorrhagic Fever o DHF) che può complicarsi con uno shock ipovolemico (Dengue Shock Syndrome o DSS). Vi sono solo quattro sierotipi di questo RNA-virus appartenente alla famiglia dei Flavivirus, come il virus della Febbre gialla: den-1, 2, 3, 4. L'infezione con un sierotipo conferisce in genere immunità a vita, ma solo nei confronti di quel sierotipo. Il virus è stato isolato da scimmie in vari paesi ma l'importanza del serbatoio animale non è chiara, ed è probabilmente secondaria: le epidemie umane, infatti, non mostrano correlazione con la distribuzione dei primati inferiori. Il virus è patogeno solo per l'uomo e l'infezione conferisce immunità a vita contro lo stesso sierotipo, ma immunità parziale e di breve durata contro gli altri sierotipi per cui nuove infezioni sono possibili anche dopo breve tempo. Tutti i sierotipi possono essere associati a DHF: le principali epidemie in Asia e A. Latina sono state associate con i virus den-2,3,4. La diagnosi clinica della malattia si basa sui criteri stabiliti dall'OMS per la definizione delle forme cliniche di Dengue. Si definisce probabile DF un caso di: febbre acuta con due o più dei seguenti sintomi: cefalea, dolore retroorbitale, mialgia, artralgia, eruzione cutanea, manifestazioni emorragiche, leucopenia, con sierologia compatibile o con presenza di altri casi nella stessa zona. La DF è confermata in presenza di almeno uno dei seguenti criteri: isolamento virale in coltu-

ra, dimostrazione di antigene virale in siero o tessuti, PCR positiva su siero e/o tessuti e/o liquor, aumento di almeno 4 diluizioni del titolo IgM e/o IgG in sieri successivi. La diagnosi di DHF viene posta, sempre secondo la definizione dell'OMS, quando sono presenti tutti i seguenti sintomi: febbre o storia di febbre da 2-7 giorni, o febbre bifasica, tendenza emorragica (almeno uno tra: tourniquet test positivo; petecchie, ecchimosi o porpora; sanguinamento da mucose; ematemesi o melena) piastrinopenia (≤ 100.000), evidenza di perdita plasmatica che si manifesta o con un aumento dell'Ht superiore al 20% sulla "media" o con una riduzione dell'Ht superiore al 20% dopo ripristino del volume plasmatico o con comparsa di versamento pleurico e/o ascite e/o ipoproteinemia. La DSS viene confermata in caso di presenza di tutti i sintomi della DHF più polso rapido e debole, ipotensione per l'età, cute fredda e umida, irrequietezza. Per quanto riguarda la patogenesi della DHF, l'infezione con un diverso sierotipo stimolerebbe la produzione di anticorpi eterotipici cross-reattivi incapaci di neutralizzare il virus. La diagnosi di laboratorio si basa sul dosaggio degli anticorpi specifici. In caso di infezione primaria in soggetti non vaccinati per febbre gialla le IgM appaiono nella fase febbrile o poco dopo (99% entro il X giorno), presentano un picco ai 15 giorni e rimangono dosabili per 2-3 mesi; le IgG appaiono poco dopo. In caso di infezione secondaria o in soggetti vaccinati per febbre gialla, le IgM si riscontrano a livelli molto inferiori, con cinetica simile e quindi spesso indosabili in fase acuta, mentre le IgG appaiono anche prima, presentano un picco dopo 2 settimane e declinano lentamente in 3-6 mesi. La prima segnalazione di epidemie di Dengue classica risale al 1779/80 in Asia, Africa e Nord America. Generalmente c'erano lunghi intervalli di tempo tra le epidemie (10-40 anni) perché virus e vettori viaggiavano solo per mare. Una pandemia mondiale di Dengue è iniziata nel Sud est Asiatico dopo la II guerra mondiale e si è intensificata durante gli ultimi 15 anni. La distribuzione geografica di virus e vettori si è estesa ed è comparsa DHF nel Pacifico e nelle

Americhe. Nel Sud est asiatico la prima epidemia di DHF è apparsa negli anni 50 a Manila e dal 75 la DHF è diventata una causa importante di morte ospedaliera tra i bambini in molti paesi di questa regione. Nel anni 80-90 la DHF ha causato epidemie in India, Pakistan e Sri Lanka. Nelle Americhe il virus 2 era presente fin dal 70; nel 77 è stato introdotto il virus 1, nell'81 il virus 4 che ha causato a Cuba la più grande epidemia di DHF nelle Americhe. Dal 1997, 18 paesi del continente americano hanno riportato casi confermati di DHF, che attualmente è endemica in alcuni di essi. Per dare un'idea dell'estensione del problema negli ultimi decenni basta ricordare che mentre negli anni 50 veniva riportata dall'OMS una media di circa 900 casi di DHF all'anno, nel 1998, sono stati notificati 1.2 milioni di casi di DF e DHF con 15.000 decessi. Il numero reale delle infezioni è sicuramente molto maggiore di quanto risulti dai dati notificati. Da modelli statistici si stima che vi siano attualmente oltre 50 milioni di nuovi casi all'anno nel mondo. In Europa i 34 centri che realizzano un monitoraggio della patologia di importazione, dal 99 al 2003 hanno segnalato un totale di 604 casi di Dengue, di cui solo due come DHF. Una zanzara del genere *Aedes* è il vettore della malattia. *Aedes aegypti*, *A. albopictus*, *A. polynesiensis*, *A. scutellaris* sono le specie più coinvolte nella trasmissione. Il vettore più efficiente e il più antropofilo è l'*A. aegypti*, principale responsabile delle epidemie. E' uno scarso volatore, rimane infetta a vita, non sopravvive alla stagione invernale ma le uova sopravvivono all'essiccazione per più di un anno. Un vettore sempre più diffuso nell'area mediterranea meno efficace, ma responsabile comunque di epidemie è *Aedes albopictus*: la sua diffusione costituisce un fattore di rischio per epidemie locali.

BIBLIOGRAFIA

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dhspot98.htm>:

<http://www.who.int/tdr/diseases/dengue/>:

<http://www.who.int/tdr/diseases/dengue/pubs.htm>.

S2.2

SARS: UPDATES; NEWS AND HIGHLIGHTS

Klenk, H.D.

Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg, Germany

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) is a life-threatening form of atypical pneumonia that recently emerged in Guangdong Province, China and was recognized first by the Italian physician Carlo Urbani as a new respiratory disease. A previously unknown

coronavirus (SARS-coronavirus; SARS-CoV) was isolated from SARS patients and was concluded to be the causative agent. The prevention and/or containment of future SARS-CoV outbreaks will depend on our ability to understand SARS-CoV biology, pathogenesis, and evolution and to translate this knowledge into an overall strategy to combat this novel and potential lethal coronavirus infection. The development of specific antiviral compounds and a vaccine against the SARS-CoV are important priorities for the international scientific community.

S2.3

THE EMERGENCY OF WEST NILE FEVER IN THE USA: UNDERSTANDING A NEW INFECTIOUS DISEASE

Mahy B.W.J.

Mahy BWJ, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, USA.

West Nile virus (WNV) is a species in the genus *Flavivirus*, which was first isolated from a human with febrile illness in Uganda in 1937. It causes a short febrile illness in humans, especially children, but a more severe disease which can be fatal occurs following infection of elderly people. The virus infects birds and many mammals as well as mosquitoes of several different species, though birds are the natural reservoir host.

The virus caused occasional outbreaks of human disease in Israel, France and South Africa over the 50 years since its discovery, but was not considered a serious public health problem. Then in the mid-1990s, the virulence of WNV apparently changed, and epidemics and epizootics of severe neurological disease were observed in the Mediterranean basin and surrounding countries, finally spreading to the USA in 1999.

When analysed by nucleotide sequencing, the virus that was first detected in New York in 1999 was found to have an identical sequence to a virus isolated from an epizootic in domestic geese in Israel in 1998.

How WNV moved from Israel to the USA in 1999 is not known, but whatever the means of introduction the highly virulent WNV strain rapidly became established within the USA, and proved particularly damaging to many bird species, such as the American crow (*Corvus brachyrhynchos*), thousands of which have died in the five years since the virus was introduced. Since competent mosquito vectors for WNMV exist throughout the Western Hemisphere, rapid spread of WNV activity has occurred to the Caribbean, Mexico,

Central and South America, as well as north into Canada. By the end of 2003, WNV had spread to virtually every state in the US, and CDC received reports of 8567 cases of human infection, 199 of which were fatal. In addition there were reports of 11,350 dead birds and 4,146 horses with WNV infection. Possible approaches to the control of this newly emergent mosquito-borne disease will be discussed.

S2.4

EVOLUZIONE DELLO SPETTRO D'OSPITE DEI VIRUS: DALL'ANIMALE ALL'UOMO

Cancellotti M.F.

Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria

Da alcuni decenni si intensificano le segnalazioni di insorgenza nell'uomo di infezioni "emergenti" che originano da contatti diretti ed indiretti con animali domestici o selvatici. Alcune di queste infezioni sono di tipo sporadico e tendono ad autolimitarsi, senza che si realizzi facilmente il passaggio da uomo ad uomo. Si possono ricordare i casi giovanili della variante della CJD, riconducibili alla diffusione incontrollata della BSE negli allevamenti bovini inglesi; i casi recenti di infezione da Monkeypox virus, originati dalla manipolazione di animali selvatici, come il ratto del Gambia, reservoir in natura del virus, assunto al ruolo di animale da compagnia in Paesi evoluti economicamente. Altre infezioni possono dare invece origine ad epidemie importanti. Il riferimento va ai retrovirus dei primati causa di immunodeficienza, al coronavirus agente di SARS, ai diversi stipiti di influenza aviaria che con crescente frequenza infettano l'uomo in modo diretto. Non può essere ignorata la imprevista evoluzione epidemiologica del virus West Nile che dal vecchio Mondo, dove circolava in forma sporadica e perlo più benigna, è passato nel nuovo Mondo dando origine ad epidemie con percentuali di morbilità e di letalità elevate nell'uomo e negli animali. Cambiamenti ambientali e climatici derivati dalla costruzione di dighe sul Nilo e sul Niger hanno permesso, alla fine degli anni settanta, il passaggio dal sud del Sahara al bacino del Mediterraneo del virus della Rift valley fever, pericoloso agente di malattia emorragica nell'uomo e negli animali. Il ripetersi di emergenze epidemiche è in gran parte riconducibile alle profonde alterazioni che si stanno portando all'intero ecosistema a causa di disboscamenti, irrigazioni, espansione delle attività agricole, abbandono di territori, eventi bellici. Animali selvatici che nel corso della evoluzione hanno raggiunto un optimum adattativo con determinati patogeni, senza subirne conseguenze ma fungendo da loro reservoir, vengono a contatto con l'uomo o con animali

sinantropici ed in tal modo è possibile il passaggio di agenti infettanti tra specie diverse. Modificazioni del clima causate in vaste regioni può portare alla comparsa o all'aumento di artropodi ematofagi che disseminano molte delle infezioni virali. Anche nuove mode alimentari e la convivenza con animali selvatici in ambienti domestici possono causare la insorgenza di focolai di malattia trasmissibile.

La complessità dei cicli reservoir-ospite-virus-vettore nei diversi ecosistemi e la attuale carenza di conoscenze su molti di essi rendono difficile adottare misure di prevenzione e di controllo adeguate e tempestive. L'approccio multidisciplinare (medici, veterinari, agronomi, meteorologi, esperti di gestione ambientale etc.) può permettere di affrontare e controllare l'insorgenza e la diffusione di infezioni emergenti.

relazioni

SESSIONE 3

La diagnostica della tubercolosi: qualità diagnostica e costi gestionali

Mercoledì 9 giugno 2004, 9.00-13.00 Sala Carraresi

S3.1

EPIDEMIOLOGIA DELLA TUBERCOLOSI IN ITALIA

Girardi E.

*Istituto Nazionale per le Malattie Infettive
Lazzaro Spallanzani, Roma*

A livello globale esistono grandi differenze nell'incidenza di tubercolosi. Si va infatti da aree con un'incidenza stimata superiore a 100/100.000 (gran parte dell'Asia e dell'Africa), ad aree con incidenza tra 25 e 100/100.000 (America Centrale e Meridionale, ed Est Europeo) ad aree con incidenza <25/100.000 (i Paesi industrializzati). In Europa i valori di incidenza più bassi si osservano nei Paesi Occidentali, mentre si raggiungono valori superiori a 100.000 negli stati dell'ex Unione Sovietica; l' Est Europeo è l'unica parte del nostro continente dove la tubercolosi è in crescita. In Italia i valori di incidenza sono stabili da circa 20 anni: i casi notificati si aggirano intorno a 6 per 100.000 abitanti anche se si stima un'incidenza reale superiore di circa il 50%.

E' possibile comprendere le dinamiche epidemiche della tubercolosi a partire dalla storia naturale dell'infezione tubercolare. Si stima che tra le persone che acquisiscono l'infezione tubercolare, circa il 5% si ammala entro due anni ed un altro 5% nel corso della vita. Tradizionalmente si riteneva che nei paesi a bassa incidenza la grande maggioranza dei casi di tubercolosi fosse dovuta a riattivazione di un'infezione acquisita molti anni prima, ma studi di epidemiologia molecolare hanno dimostrato che almeno un terzo dei casi nel mondo industrializzato, inclusa l'Italia, è dovuto alla progressione a malattia di un'infezione recente, e questa proporzione può essere molto superiore nei pazienti con infezione da HIV. I casi "da riattivazione" sono particolarmente frequenti tra gli anziani, tra i

quali si osserva in Italia un'alta proporzione dei malati di tubercolosi. I principali fattori che hanno avuto un impatto sulle dinamiche epidemiche della tubercolosi in Italia negli anni più recenti sono stati l'immigrazione da Paesi ad alta endemia tubercolare e la diffusione dell'infezione da HIV; si stima che le persone nate fuori dal nostro Paese e quelle con infezione da HIV rappresentino, rispettivamente, il 30% ed il 10% dei malati di tubercolosi.

La mortalità per tubercolosi è diminuita notevolmente in Italia negli ultimi 25 anni, e questa diminuzione di mortalità è più spiccata di quella osservata per le malattie infettive nel loro complesso. Tuttavia in Italia si registrano tuttora circa 500 decessi per anno per tubercolosi e questi decessi interessano quasi esclusivamente i pazienti ultra sessantacinquenni.

S3.2

LA DIAGNOSTICA DELLE INFEZIONI DA MICOBATTERI IN ITALIA: LO STATO DELL'ARTE

Piersimoni C.

Comitato Micobatteri AMCLI

Il Comitato Micobatteri AMCLI ha condotto una indagine conoscitiva per valutare lo stato della diagnostica dei micobatteri in Italia. Sono stati focalizzati gli aspetti relativi alla disponibilità di metodi rapidi per l'isolamento e l'antibiogramma di Mycobacterium tuberculosis complex (MTB) in conformità a quanto suggerito nel 1993 dal Centers for Disease Control.

Metodi

L'indagine, in parte patrocinata dagli Assessorati Regionali alla Sanità, in parte realizzata come iniziativa AMCLI, è stata condotta nel periodo 1999-2001 interessando tutto il territorio nazionale. Tramite la

compilazione di un questionario, si richiedevano i dati quali-quantitativi relativi alla attività diagnostica dell'anno precedente ed il possesso delle principali dotazioni di sicurezza connesse alla diagnostica dei micobatteri. Hanno risposto all'indagine 355 laboratori in 18 regioni pari a circa il 60% dei laboratori pubblici ospedalieri italiani.

Risultati

Per quanto riguarda la microscopia, 51 laboratori, pari al 14.4% usano la colorazione in fluorescenza per la ricerca dei bacilli alcol acido resistenti (BAAR).

La coltura viene eseguita in 298 laboratori, di cui 166 (55.7%) adottano la tecnica standard di decontaminazione (NALC-2%NaOH) e 157 (52.7%) impiegano correttamente la combinazione terreno liquido più terreno solido per la coltura dei micobatteri.

La identificazione degli stipiti isolati a livello di MTB viene eseguita in 85 (28.6%) laboratori con tecniche di biologia molecolare ed in 50 (16.1%) tramite test biochimici o NAP test, mentre 165 laboratori pari al 55.3% non identificano gli stipiti isolati.

I test di sensibilità per MTB sono eseguiti in 83 laboratori; di questi 28 (34.4%) impiegano terreni all'uovo, mentre 54 (65.6) utilizzano i più rapidi sistemi liquidi.

I test di amplificazione sono eseguiti in 73 laboratori su 355 (20.6%) per un totale di oltre 20.000 campioni all'anno. La quasi totalità dei laboratori usa sistemi commerciali semiautomatici o manuali per lo più privi di controllo interno di amplificazione.

I dati raccolti dimostrano che la maggioranza dei laboratori ospedalieri di medie-grandi dimensioni utilizzano metodiche adeguate per qualità e rapidità, ma purtroppo esiste ancora una larga fascia di piccoli laboratori che eseguono la micobatteriologia in maniera assolutamente incongrua sia per quanto attiene ai risultati di laboratorio che alle norme di sicurezza.

Conclusioni

E' nostra convinzione che in un paese a bassa prevalenza di TB come l'Italia, l'implementazione dei metodi rapidi associata al riordino dei laboratori mediante concentrazione della diagnostica dei micobatteri e creazione di centri di riferimento regionali appare oggi la strategia più efficace sia dal punto di vista della qualità diagnostica che del rapporto costi-benefici.

S3.3

LA DIAGNOSTICA DEI MICOBATTERI IN EUROPA

Marchetti D.

*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia
Azienda Usl di Bologna*

La diagnostica dei Micobatteri nel Laboratorio di Microbiologia ha caratteristiche, organizzazione e ope-

ratività del tutto peculiari e rappresenta un modello particolare di attività di microbiologia nell'ambito del Laboratorio.

Il Comitato Micobatteri dell'AMCLI aveva di recente promosso a livello nazionale una indagine conoscitiva presso i Laboratori italiani sulla struttura e sull'organizzazione di questo settore del Laboratorio di Microbiologia, ricevendo da tutte le regioni dati molto significativi sulla caratteristica del servizio, la metodologia utilizzata per la diagnostica e sugli indicatori di attività delle singole sezioni.

Il successo e l'interesse scaturiti da questa prima indagine ha spinto il Comitato Micobatteri dell'AMCLI a promuovere una nuova indagine su questo tema a livello europeo. L'indagine è stata svolta contattando colleghi e servizi di Micobatteriologia operanti nell'Europa comunitaria e nei paesi dell'Est europeo dove il problema tubercolosi rappresenta ancora una sfida importante a livello diagnostico e di fatto anche a livello di sorveglianza e di prevenzione dell'infezione.

Attraverso i colleghi della UEMS (European Union of Medical Specialties), la società europea di cui l'AMCLI fa parte, è stato somministrato a molti colleghi europei che si interessano di micobatteri, un questionario "Questionnaire on methods and procedures used for clinical Micobacteriology in the European Union" proposto dal Comitato Micobatteri AMCLI.

Il questionario era articolato in quattro parti: nella prima e seconda parte erano contenute domande relative ai metodi di screening dei campioni, alle principali procedure di decontaminazione, al tipo di coltura utilizzato, se su mezzi solidi o liquidi, alla tipo di diagnostica effettuata, se con metodologia tradizionale o con metodi di biologia molecolare e alla percentuale di colture positive riscontrate.

Il terzo punto del questionario riguardava il tipo di refertazione ed i tempi entro i quali veniva inviata al clinico la risposta.

Nella quarta parte si richiedevano notizie sul tipo di struttura del Laboratorio di Micobatteriologia; si chiedeva se si trattasse di un settore separato dal resto del Laboratorio e dedicato a questa diagnostica, quale fosse il grado di sicurezza del Laboratorio, quali le principali misure adottate e di quale strumentazione fosse dotato.

Le risposte ricevute dai singoli paesi hanno dimostrato una notevole difformità dell'organizzazione e della conduzione dei singoli servizi.

Le legislazioni nazionali di riferimento sono assai carenti su questo argomento; le considerazioni che i risultati di una simile indagine consentono di auspicare ci invitano a caldeggiare un intervento della stessa Comunità Europea su tale materia. L'intervento, con l'apporto indispensabile dei suoi professionisti di tale materia, dovrebbe servire a definire, pur nel rispetto della indipendenza e della sovranità dei singoli stati membro, requisiti minimi di organizzazione, sicurezza e qualità nell'ambito dei quali si deve operare.

Questa nuova organizzazione porterebbe ad una miglior standardizzazione della diagnostica e di fatto ad una maggiore confrontabilità dei dati nazionali ed un aggiornamento efficace della realtà europea.

Un corretto approccio a questa diagnostica permetterebbe di coniugare facilmente efficienza ed efficacia delle indagini effettuate, maggiore tempestività di risposta all'indagine ed di fatto una migliore sorveglianza e prevenzione di questa infezione.

S3.4

LINEE GUIDA E REQUISITI MINIMI PER I LABORATORI DI RIFERIMENTO A LIVELLO REGIONALE E NAZIONALE

Tortoli E.

*Laboratorio di Microbiologia e Virologia.
Ospedale di Careggi, Firenze*

Nonostante che in tutto il mondo industrializzato la pratica di concentrare in un numero programmato di laboratori le procedure della diagnostica micobatteriológica avanzata sia, ormai da anni, una realtà, in Italia il principio stenta ancora ad affermarsi. Solo in pochissime regioni i centri di riferimento, ancorché previsti dal decreto legislativo 31/3/98, sono oggi una realtà. L'impressione è che l'immobilismo di molte istituzioni sia da imputare soprattutto alla incapacità delle medesime di reperire i parametri utili all'individuazione dei laboratori di riferimento. La presente iniziativa del Comitato per lo Studio dei Micobatteri (CoSMic) vuole essere una proposta utile quantomeno a stimolare una costruttiva discussione.

Per quanto riguarda le linee guida diagnostiche il vuoto è stato recentemente colmato dal Ministero della Salute che ha fatto proprie le linee guida messe a punto negli ultimi anni dal CoSMic. È quindi indubbio che è ad esse che i centri di riferimento, come tutti i laboratori che eseguono indagini micobatteriológicas, debbano far riferimento per le prestazioni di loro competenza. Più complesso è il discorso dei requisiti minimi. Al riguardo, il più autorevole punto di riferimento ci sono sembrati i CDC ed è alle raccomandazioni di questi ultimi che il CoSMic ha largamente attinto. Per quanto riguarda l'organizzazione del laboratorio sono previsti suggerimenti riguardanti il personale, gli spazi, le istruzioni operative, la valutazione di qualità (sia interna che esterna) e la trasmissione dei referti. Indicazioni sono previste anche per le attrezzature e la strumentazione. Particolare attenzione è rivolta alla tipologia delle prestazioni ed ai carichi di lavoro minimi necessari al mantenimento di un adeguato livello qualitativo. L'aggiornamento del personale, al di là di quanto previsto dall'ECM, dovrà prevedere l'organizzazione e la frequenza di corsi "specifici" e la partecipazione all'at-

tività pubblicistica e congressuale nazionale e, soprattutto, internazionale.

Difficili da definire, in una situazione nebulosa come quella italiana, sono i requisiti di un centro di riferimento nazionale; il suggerimento più ovvio pare l'implementazione, al livello più alto, di tutti i requisiti previsti per i centri regionali.

S3.5

LA DIAGNOSTICA DELLE INFEZIONI DA MICOBATTERI NEL VENETO: IL PASSATO ED IL PRESENTE. LA STANDARDIZZAZIONE DELLA DIAGNOSTICA E LA RAZIONALIZZAZIONE DELLE RISORSE

Scarparo C.

*Centro di Riferimento della Regione Veneto
per i Micobatteri
Unità Operativa di Microbiologia e Virologia,
Ospedale San Bortolo, Vicenza*

La tubercolosi costituisce ancora oggi un importante problema di salute pubblica in tutto il mondo, sia nei Paesi in via di sviluppo sia nei Paesi industrializzati, soprattutto in popolazioni a rischio quali i pazienti affetti da AIDS e gli immigrati. Il Laboratorio di Micobatteriológica Clinica assume un ruolo fondamentale nella diagnosi e nel controllo della tubercolosi e delle micobatteriosi. Nel 1993, i CDC di Atlanta hanno emanato delle raccomandazioni sulla diagnostica delle infezioni da micobatteri:

- 1) utilizzare la colorazione con fluorocromi e comunicare al clinico il risultato entro 24 ore lavorative dal ricevimento del campione;
- 2) eseguire sempre sui campioni clinici un esame colturale sia in terreno solido che in terreno liquido;
- 3) utilizzare sonde molecolari, Nap test o HPLC per poter rapidamente identificare l'isolato come *M. tuberculosis complex* (MTC) e comunicare entro 10-14 giorni il risultato;
- 4) valutare la farmacosensibilità di tutti i ceppi di MTC di primo isolamento in terreno liquido radiometrico Bactec o sistemi similari e comunicare i risultati entro 15-30 giorni dal ricevimento del campione;
- 5) utilizzare dei controlli di qualità di cui devono essere registrati i risultati e rivedere attrezzature e procedure di laboratorio necessarie a garantire un alto grado di sicurezza. I principali organismi internazionali ritengono necessario, per i Paesi a bassa incidenza di tubercolosi, centralizzare le procedure diagnostiche in un numero limitato di laboratori, per i quali viene prevista una attività minima di 20 campioni alla settimana, per poter garantire un'alta qualità delle prestazioni, anche legata all'esperienza professionale degli operatori, che

si acquisisce e si mantiene con la continua attività su un adeguato numero di campioni. Per valutare la situazione della Regione Veneto è stata condotta nel 1996, in collaborazione con il Dipartimento di Igiene Pubblica, un'indagine sulla diagnostica dei micobatteri nei laboratori del Veneto relativa all'anno 1995, utilizzando un questionario. L'indagine ha consentito di verificare la situazione regionale ed ha confermato la necessità di predisporre delle linee guida organizzative, approvate dalla Giunta Regionale del Veneto con delibera n. 2824 del 05.08.1997, che prevedono una suddivisione dei laboratori in tre livelli di competenza, sulla base di prestabiliti carichi di lavoro e di requisiti minimi indispensabili, e l'individuazione di laboratorio con funzioni di Centro di Riferimento Regionale.

Per verificare l'impatto delle linee guida regionali sull'organizzazione dei laboratori è stata condotta nel 2001, sempre in collaborazione con il Dipartimento di Igiene Pubblica, una seconda indagine sulla diagnostica dei micobatteri nei laboratori del Veneto relativa all'anno 2000, utilizzando lo stesso questionario. I risultati ottenuti hanno chiaramente dimostrato che l'organizzazione e la centralizzazione costituiscono requisiti indispensabili per elevare la qualità delle indagini diagnostiche di alta specializzazione. La Regione Veneto ha fatto importanti passi in questa direzione, ma ulteriori miglioramenti sono auspicabili, anche nell'ottica di un possibile risparmio economico. La centralizzazione permette infatti:

- a) di migliorare ed uniformare la qualità delle prestazioni nell'intero territorio regionale, rendendo più rapida ed affidabile la diagnosi e la valutazione della sensibilità del MTC ai farmaci antitubercolari;
- b) di razionalizzare le risorse economiche ed umane disponibili;
- c) di approfondire le conoscenze epidemiologiche sulla diffusione della tubercolosi e sul problema dei ceppi multifarmaco-resistenti, la cui percentuale deve essere continuamente monitorata. Il laboratorio di micobatteriologia costituisce un ambiente di lavoro dove, per la pericolosità dei materiali processati e la complessità delle attività che vi si svolgono, deve essere posta una particolare attenzione alla tutela della salute e della sicurezza degli operatori sanitari (D.L. 626/94).

Un laboratorio di micobatteriologia dovrebbe necessariamente soddisfare sia tutte le norme legislative vigenti sia le precedenti raccomandazioni internazionali. Numerosi risultano pertanto i requisiti indispensabili riguardanti sia gli aspetti organizzativi che quelli prettamente strutturali. L'organizzazione riguarda principalmente:

- a) il personale dirigente e tecnico da impiegare;
- b) l'attività di laboratorio e la tipologia delle prestazioni;
- c) le attrezzature e la strumentazione necessaria;
- d) la valutazione dei carichi di lavoro e delle performance del laboratorio;

e) la presenza di istruzioni operative scritte riguardanti la raccolta e la conservazione dei campioni, l'esecuzione dei diversi test, le norme di sicurezza da adottare;

f) l'impiego dei controlli di qualità e la loro registrazione;

g) la sorveglianza epidemiologica;

h) l'aggiornamento continuo del personale dirigente e tecnico. I requisiti strutturali riguardano principalmente:

a) la disponibilità di una stanza dedicata esclusivamente alla micobatteriologia, in grado di contenere tutte le attrezzature necessarie e separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio;

b) la pressione negativa nella stanza dedicata;

c) la possibilità di chiudere a tenuta la stanza per la disinfezione;

d) una ventilazione adeguata, che permetta la filtrazione dell'aria estratta mediante un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile. L'insieme degli aspetti organizzativi e strutturali, che devono essere direttamente correlati con il bacino di utenza, consente di classificare i laboratori di micobatteriologia in diversi livelli diagnostici, sottolineando tuttavia che esistono dei requisiti minimi indispensabili perché un laboratorio possa svolgere questo tipo di diagnostica.

relazioni

SESSIONE 4

Le resistenze antibatteriche e antivirali

Giovedì 10 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala D

S4.1

STREPTOCOCCUS PYOGENES ED ERITROMICINO-RESISTENZA

Varaldo P.E.

*Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche.
Università Politecnica delle Marche, Ancona.*

Fra le antibiotico-resistenze emergenti nei patogeni comunitari, la resistenza di *S. pyogenes* all'eritromicina costituisce un problema specifico e particolarmente rilevante per l'Italia, dove raggiunge incidenze fra le più elevate al mondo (>40% in uno studio multicentrico della fine degli anni '90, contro percentuali <5% in gran parte degli altri Paesi). Incidenze di resistenza così elevate suscitano ovviamente grande preoccupazione, tanto più in un Paese come l'Italia dove, per motivi più o meno condivisibili (fra i quali l'indisponibilità della penicillina V), i macrolidi sono usati molto più che altrove nel trattamento della faringite da *S. pyogenes*. Inizialmente, l'emergere di un problema così rilevante finì per suscitare una serie di approcci tanto numerosi quanto non sempre ineccepibili dal punto di vista metodologico, per non parlare di iniziative legate a contrapposti interessi aziendali. Ora, a distanza di qualche anno, appare possibile ed opportuna un'obiettivo messa a punto su questo importante (soprattutto in Italia) problema di antibiotico-resistenza: tanto più che, in questi anni, diversi laboratori italiani hanno saputo cogliere l'opportunità offerta da questa situazione unica del nostro Paese per studiare e spiegare molti aspetti della eterogeneità fenotipica e genotipica, delle dinamiche epidemiologiche, dei meccanismi molecolari e delle basi genetiche di questa resistenza. Fra i risultati più significativi di questi recenti studi vale la pena di ricordare (i) la scoperta e la caratterizzazione dell'elemento genetico su cui è situato il gene *mef(A)*, responsabile del principale

sistema di efflusso dell'eritromicina; (ii) la scoperta di altri elementi genetici in cui *mef(A)* è associato a determinanti di resistenza ad altri antibiotici; (iii) la dimostrazione di un ruolo svolto da altri sistemi di efflusso; (iv) la documentazione di nuovi meccanismi di trasferimento e diffusione della resistenza; (v) la messa a punto di nuovi ed originali sistemi di tipizzazione; (vi) la scoperta di un'associazione fra eritromicina-resistenza e capacità di invadere cellule respiratorie, particolarmente preoccupante in quanto i ceppi resistenti/invasivi (in grado di sfuggire ai beta-lattamici grazie alla localizzazione intracellulare e ai macrolidi grazie alla resistenza) potrebbero essere più difficili da eradicare ed aver facilitato la grande diffusione di ceppi resistenti nel nostro Paese.

S4.2

ENTEROCOCCHI E VANCOMICINA-RESISTENZA: SPECIFICITÀ ITALIANE DI UN PROBLEMA GLOBALE

Pantosti A., Caprioli A.

Istituto Superiore di Sanità, Roma

Benchè la vancomicina sia stata messa in commercio negli anni 50, il suo uso non è stato molto frequente fino agli anni 70-80, quando la diffusione di ceppi di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina e la necessità di trattare le coliti da antibiotici associate al *Clostridium difficile*, hanno richiesto l'uso massiccio di questo antibiotico. Nel giro di un decennio, sono emersi soprattutto negli ospedali degli Stati Uniti ceppi di enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE). I VRE sono frequenti soprattutto tra i ceppi di *E. faecium*, una specie spesso resistente anche ad ampicillina e aminoglicosidi.

La frequenza dei VRE è aumentata considerevolmente negli anni: tra gli enterococchi isolati dal sangue negli USA è passata da 0% nel 1989 al 27.5% nel 2002.

In Europa, fino agli anni 90, i VRE sono stati isolati soprattutto da animali da allevamento e da portatori sani a livello intestinale.

Questo differente quadro è stato attribuito da una parte al minore uso di vancomicina in ambito ospedaliero, dall'altro dall'ampia utilizzazione dell'avoparcina, un antibiotico analogo alla vancomicina, come promotore di crescita nell'allevamento avicolo e suinicolo fino al 1997.

La presenza di VRE nelle feci di polli e suini e nei prodotti carnei derivati è stata documentata anche in Italia: la frequenza di isolamento si è ridotta dopo il bando dell'avoparcina da parte dell'Unione Europea, ma non si è azzerata. Per quanto riguarda la situazione delle infezioni da VRE in ambito umano, in Italia negli anni 90 sono stati descritti rari casi sporadici e alcuni focolai nosocomiali.

Nel 1995 la proporzione di VRE tra gli enterococchi isolati da infezioni in uno studio multicentrico era del 7%, con un range da 0 al 36% a seconda degli ospedali. Nel corso della sorveglianza dell'antibiotico-resistenza AR-ISS (2001-2002) è emersa una quota importante di VRE tra i ceppi isolati da sangue: 18% per la specie *E.faecium*.

Anche se una sovrastima dovuta alla segnalazione più attenta di ceppi "problematici" non può essere esclusa, questo dato è in accordo con il 19% di infezioni da VRE in Italia secondo uno studio europeo sui reparti a rischio, e appare decisamente superiore alla media degli isolamenti di VRE *E.faecium* da sangue nella maggior parte dei paesi europei (<10%) riportata dall'EARSS per il 2002.

Studi di tipizzazione molecolare hanno permesso di riconoscere un gruppo clonale di *E.faecium* portatore del gene *vanA*, che conferisce alta resistenza a vancomicina e teicoplanina, circolante in ospedali localizzati in diverse aree geografiche italiane.

Questo clone ha caratteristiche simili a quelle del clone epidemico più diffuso negli ospedali degli Stati Uniti: resistenza a beta-lattamici e aminoglicosidi e presenza del gene *esp*, marcatore di diffusività nosocomiale.

Dal momento che i ceppi di *E.faecium* *vanA*-positivi di provenienza animale sono risultati spesso sensibili a beta-lattamici e aminoglicosidi, e sempre *esp*-negativi, appare poco probabile un trasferimento diretto dagli animali di ceppi VRE causa di infezioni gravi nell'uomo.

S4.3

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-RESISTENTE: CARATTERISTICHE, EVOLUZIONE E IPOTESI PER IL FUTURO

Stefani S.

Dipartimento di Scienze Microbiologiche -
Università degli Studi di Catania

Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA) in relazione al numero di fattori di virulenza, alle strategie patogenetiche e alla capacità di sopravvivere e moltiplicarsi in svariati ambienti, risulta essere uno dei microrganismi più "flessibili" fra i patogeni nosocomiali, con recenti e preoccupanti isolamenti in ambito comunitario. Gli MRSA hanno subito una forte spinta evolutiva, mediata principalmente dall'accumulo di geni di resistenza in seguito all'uso di un numero sempre maggiore di agenti antimicrobici, ma nessun altro determinante come l'acquisizione della resistenza alla meticillina, ha consentito di attribuire a questi microrganismi una "individualità" caratteristica nell'ambito della specie *S.aureus*.

Nonostante l'acquisizione esogena di *mecA* e la sua potenziale mobilità, gli MRSA presentano una struttura di popolazione principalmente clonale: evidenze recenti hanno fatto ipotizzare che il locus *mec* sia localizzato in un ristretto gruppo di MRSA strettamente correlati tra loro e la loro fitness elevata possa derivare dal background genetico di cloni virulenti di MSSA nei quali il locus stesso possa essersi integrato a livello cromosomico, evolvendo successivamente nei diversi cloni - circa 5 distribuiti in tutto il mondo - maggiormente adattatisi nel tempo.

MecA risulta parte di un elemento genetico mobile chiamato Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC*mec*), paragonabile ad una isola di patogenicità, con la sostituzione di geni di antibiotico-resistenza anziché di virulenza. Sono stati identificati quattro tipi di SCC*mec*, che in ordine di isolamento del ceppo di riferimento sono: i) SCC*mec* type I (34 Kb) identificato nel primo ceppo di MRSA isolato nel 1961 in UK; ii) SCC*mec* type II (52 Kb) identificato in un ceppo di MRSA isolato nel 1982 in Giappone; iii) SCC*mec* type III (66 Kb) identificato in un ceppo di MRSA isolato nel 1985 in Nuova Zelanda; iv) SCC*mec* type IV (20-24 Kb) identificato in un ceppo di MRSA comunitario. Per rispondere alle domande sulla genetica di popolazione di *S.aureus*, l'analisi di sequenze nucleotidiche ed in particolare di sette geni house-keeping coinvolti nel metabolismo batterico, si è rivelata uno strumento flessibile e potente. Questa tecnica, Multi-Locus-Sequence Typing (MLST), in quanto basata sulla lenta evoluzione del "core" genomico, fornisce dei dati alta-

mente significativi sia per uno studio epidemiologico dei principali cloni, sia per studi di tassonomia e filogenesi.

L'applicazione delle metodiche classiche di tipizzazione molecolare (PFGE::*ClaI-mecA*::*ClaI*-Tn554), insieme ai dati della MLST, elaborati mediante l'algoritmo BURST e alla caratterizzazione delle diverse SCCmec, hanno permesso al nostro gruppo di ricerca di intraprendere uno studio sulle correlazioni genetiche degli MRSA diffusi in Italia, predire il genotipo ancestrale dal quale discendono attualmente due dei cloni maggiormente diffusi, "Romano" e "Italiano" e stabilire le relazioni evolutive che intercorrono tra questi rispetto ai cloni di *S.aureus* più diffusi in ambito internazionale.

Dai nostri risultati è emerso che il clone Romano ha subito, negli anni, un'evoluzione consistente nell'acquisizione di due copie del Tn554 e nell'integrazione del plasmide pUB110 a valle del gene *mecA* (passaggio dal clonal-type II::NH::C a I::J::C); questi eventi di ricombinazione hanno portato alla modificazione di SCCmec-type da I a IA e l'acquisizione di nuovi determinanti di resistenza ha reso questa nuova variante resistente a eritromicina, spectinomicina e clindamicina e con bassi livelli di sensibilità ai glicopeptidi.

Tali ceppi mantengono inalterato il loro sequence type ST247 (3-3-1-12-4-4-16), PFGE-type (C) ed appartengono al *agr* type I. Al contrario, gli isolati appartenenti al clone Italiano mostrano invariate negli anni, le loro caratteristiche fenotipiche (sensibilità a tetraciclina e rifampicina) e genotipiche (clonal-type II::E::E; ST228: 1-4-1-4-12-24-29; SCCmec I e *agr* type II), suggerendo l'immediato successo ottenuto da questi ceppi, nell'ambiente.

Attraverso la correlazione con i principali cloni diffusi in ambito internazionale è emerso che gli MRSA appartenenti a questi due cloni si evolvono secondo due linee evolutive differenti.

Gli isolati appartenenti al clone "Romano" hanno subito eventi di ricombinazione recenti, ma derivano dallo stesso progenitore dei cloni "Arcaico", "Iberico" e "Brasiliano".

Mentre, il background genetico del clone "Italiano", correlato a quello di ceppi di *S.aureus* con diverse caratteristiche (MSSA, MRSA e GISA), conferma l'ipotesi del trasferimento orizzontale di *mecA* tra differenti lineages ancestrali.

Il cambiamento della epidemiologia di *S.aureus* meticillino-resistente è certamente un aspetto molto preoccupante, che unito alla sempre maggiore insensibilità agli antibiotici (allarmante è la recente acquisizione del gene *vanA*), richiede studi sempre più approfonditi al fine di rispondere a quesiti tuttora aperti.

La pressione selettiva degli antibiotici è certamente responsabile della disseminazione di cloni resistenti: un uso corretto degli antibiotici potrebbe evitare almeno l'aumento indiscriminato nella prevalenza.

S4.4

GRAM-NEGATIVI E NUOVE β -LATTAMASI

Rossolini G.M.

Dipartimento di Biologia Molecolare,
Laboratorio di Fisiologia e Biotecnologia dei Microrganismi,
Università di Siena

Dati recenti di sorveglianza epidemiologica indicano che i batteri Gram-negativi multiresistenti stanno riemergendo in modo significativo come causa di infezioni nosocomiali. Tra i patogeni Gram-negativi, i principali problemi di chemioresistenza si incontrano attualmente nelle *Enterobacteriaceae*, in *Pseudomonas aeruginosa* ed in altri Gram-negativi nonfermentanti, e possono riguardare tutte le principali classi di farmaci antimicrobici.

Riguardo agli antibiotici β -lattamici, che sono i farmaci più utilizzati per la terapia delle infezioni da Gram-negativi, i più importanti problemi di resistenze emergenti sono quelli a carico delle cefalosporine a spettro esteso e dei carbapenemi, e il principale meccanismo di resistenza acquisita a questi farmaci è rappresentato dalla produzione di enzimi degradativi (β -lattamasi), anche se i difetti di permeabilità e i sistemi di efflusso attivo possono contribuire in maniera rilevante, soprattutto in alcune specie.

Nelle *Enterobacteriaceae* i problemi di resistenza ai β -lattamici riguardano principalmente le cefalosporine a spettro esteso, e interessano anche quelle specie (ad es. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*) che non sono capaci di dare origine a mutanti resistenti iperproduttori di una β -lattamasi endogena di classe molecolare C. Tra gli enzimi acquisiti più frequentemente responsabili di questo fenotipo di resistenza figurano le cosiddette β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) di classe A, che idrolizzano le cefalosporine a spettro esteso e i monobattami, ma non le cefamicine o i carbapenemi. Si tratta più spesso di varianti degli enzimi TEM-1/2 o SHV-1, a codificazione plasmidica, che hanno evoluto la capacità di idrolizzare questi composti a seguito di mutazioni puntiformi. Tuttavia possono anche essere coinvolti enzimi di natura diversa, alcuni dei quali presentano una notevole prevalenza in certe aree geografiche (es. le ESBL di tipo CTX-M). Più rara per il momento è la presenza di carbapenemasi a serina (di classe molecolare A o D) e di carbapenemasi a zinco (classe molecolare B), e di β -lattamasi di classe C a codificazione plasmidica. In *P. aeruginosa* i problemi di resistenza riguardano tutti i β -lattami anti-pseudomonas, compresi i carbapenemi. In questa specie il repertorio degli enzimi emergenti è ampio e include varie ESBL di classe A (di natura generalmente diversa dai derivati

TEM ed SHV; le principali sono gli enzimi di tipo PER, GES/IBC e VEB), ESBL di classe molecolare D (ad es. OXA-10, OXA-18), e le carbapenemasi a zinco di tipo IMP, VIM, SPM e GIM.

Queste ultime destano particolare preoccupazione a causa del loro spettro di substrati estremamente ampio (che include praticamente tutti i β -lattami ad eccezione dei monobattami) e della loro insensibilità agli inibitori enzimatici attualmente disponibili.

In *Acinetobacter*, infine, la resistenza acquisita ai carbapenemi può essere mediata dall'acquisizione di carbapenemasi a serina di classe D (ad es. OXA-23, OXA-24) o di carbapenemasi a zinco di tipo IMP o VIM, che rappresentano i principali tipi di β -lattamasi acquisite emergenti in queste specie.

La disseminazione dei geni per le ESBL e le carbapenemasi che attualmente circolano nei patogeni Gram-negativi è dovuta alla loro associazione con elementi genetici mobili di varia natura (plasmidi coniugativi, trasposoni, cassette genetiche mobili inserite in integroni), che possono permettere più livelli di mobilitazione, e alla espansione clonale dei ceppi che hanno acquisito il gene di resistenza.

La rilevazione dei ceppi produttori di ESBL e di carbapenemasi acquisite rappresenta un aspetto molto importante nel laboratorio di batteriologia clinica, sia a scopo diagnostico sia per la sorveglianza epidemiologica di questi geni di resistenza.

Il fenotipo di resistenza può essere suggestivo per la produzione di alcuni di questi enzimi, ma non è un indicatore sufficientemente sensibile e specifico.

Numerosi test fenotipici sono attualmente disponibili per la rilevazione dei ceppi produttori di ESBL e di carbapenemasi a zinco.

L'identificazione precisa del gene di resistenza richiede tuttavia l'impiego di indagini molecolari.

S4.5

DETERMINAZIONE DELLA FARMACORESISTENZA DI HIV

Menzo S.

Istituto di Microbiologia, Università di Ancona

Dopo alcuni anni dall'introduzione delle terapie antiretrovirali di combinazione con più classi di farmaci, è ormai chiaro che l'obiettivo di eradicare con questi l'infezione da HIV è irrealizzabile.

Per quanto potente possa essere l'azione antivirale, è stato dimostrato che *in vivo* rimane sempre una residua replicazione virale che, con il tempo, selezionerà varianti resistenti ai farmaci utilizzati.

In un tempo variabile di alcuni anni, che dipende dalle caratteristiche dei composti utilizzati, dalla precedente storia terapeutica di ogni paziente (e eventualmente del

suo virus anche prima dell'infezione) e dalla sua aderenza alla terapia, sembra inevitabile che il virus diventi resistente a tutte le classi di farmaci antiretrovirali attualmente disponibili.

Per questo motivo rilevare precocemente l'insorgere di virus resistenti è della massima importanza, per poter gestire razionalmente la terapia in ogni soggetto a livello del singolo paziente ma anche a livello di popolazione.

Gli strumenti tecnici per assolvere a questo compito non mancano, e si avvalgono di una duplice metodologia.

Da una parte lo studio del genotipo virale, inteso come sequenziamento del genoma virale ed interpretazione delle combinazioni di mutazioni associate a resistenza, dall'altra l'analisi fenotipica, ossia lo studio del virus isolato dai pazienti (o di chimere ricombinanti con porzioni genomiche amplificate *ex vivo*) e cimentato *in vitro* con i farmaci.

Quest'ultimo approccio è complesso, molto più laborioso, non è eseguibile nella maggior parte dei laboratori di virologia diagnostica e è perciò estremamente costoso.

Tuttavia il suo impiego è indispensabile per la comprensione della funzione biologica delle mutazioni di resistenza e per gettare le basi dell'interpretazione genotipica.

Al momento è anche l'unico metodo per determinare la capacità replicativa conferita dalle sequenze mutate e il potere patogeno dei virus resistenti.

In questo scenario il nostro gruppo ha svolto diversi studi per caratterizzare le relazioni tra le sequenze virali mutate isolate *in vivo* e la funzione biologica delle proteine da esse codificate.

Abbiamo messo a punto metodi di ingegneria genetica che permettono l'inserzione nello scheletro del clone molecolare virale NL4-3, opportunamente modificato, di sequenze esogene relative al gene pol o al gene env. Inoltre, esperimenti di mutagenesi sito-diretta hanno evidenziato il ruolo di specifici residui aminoacidici sul fenotipo conferito al virus ricombinante e la possibilità di modulare la capacità replicativa di varianti mutagenizzate *in vitro*.

L'insieme dei dati fenotipici accumulatosi negli anni da parte di diversi laboratori ha permesso una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base della selezione delle mutazioni.

Nella prospettiva di una continua rincorsa farmacologica ai virus resistenti con l'introduzione di nuovi composti antiretrovirali (appartenenti sia a nuove che a vecchie classi) gli studi fenotipici rappresentano uno strumento indispensabile per valutarne l'efficacia antiretrovirale su ceppi virali multiresistenti e ottimizzare fin dall'inizio il loro impiego.

S4.6

CELLULAR RESISTANCE TO THE ANTIRETROVIRAL DRUGS**Antonelli G.***Department of Experimental Medicine and Pathology,
Virology Section, University "La Sapienza"*

It has been proposed that the declining efficiency of antiretroviral agents of HIV infection may also depend on cellular factors at their site of action. Two of them have been considered with particular emphasis. They are: i) the defective intracellular metabolism of nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) in target cells and the altered uptake, and ii) efflux of NRTI and protease inhibitors (PIs) by cellular transporter molecules. Several studies have shown that: changes in the activities of various purine and pyrimidine biosynthetic enzymes may occur in lymphocytes of HIV-infected patients; HIV-infected patients on prolonged treatment with nucleoside analogs, such as AZT, show significantly decreased activity of TK compared to untreated HIV-infected persons; a inter-individual variability in plasma drug concentration and biosynthetic enzymes activity do exist; non nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), NRTI and PIs are substrates for the so-called multidrug membrane transporters and the overexpression of multidrug transporters significantly reduces the accumulation of PIs. As regard to the latter issue, it is known that the ATP-binding cassette transporter proteins such as the Pgp (MDR), and the newly discovered family of multidrug resistance-associated proteins (MRP1-8), promote the active extracellular efflux of a wide variety of therapeutic drugs and overexpression of some of them lowers intracellular concentration of PIs. In a very near future such mechanisms, also called "cellular drug-resistance", might be taken into account, together with other immunological, virological and behavioural factors, to explain the "drug failure" and/or the variability of response in HIV patients undergoing an antiretroviral treatment.

relazioni

SESSIONE 5

Trapianti: il contributo del laboratorio di microbiologia

Giovedì 10 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala F

S5.2

DONATORE E RICEVENTE: CRITERI MICROBIOLOGICI E VIROLOGICI DI IDONEITÀ ALL'ESPIANTO ED AL TRAPIANTO

Giraldi C.

Servizio Microbiologia e Virologia, P.O. dell'Annunziata

Il "Report 2003" sull'attività di donazione e trapianto di organi in Italia, elaborato dal Centro Nazionale Trapianti (CNT), mostra un quadro sicuramente positivo ed indica un aumento del numero dei donatori effettivi per milione di abitanti, che sale dai 18,1 del 2002 ai 18,5 del 2003; futuri obiettivi sono indirizzati alla qualità del sistema trapianti per migliorare l'assistenza sanitaria e lo stato di salute dei pazienti e per innalzare il grado di soddisfazione dei cittadini offrendo strumenti di trasparenza.

Il laboratorio di Microbiologia e Virologia rientra in questo complesso modello organizzativo operante sulle donazioni e sui centri trapianti per stabilire ed accertare i criteri microbiologici e virologici di idoneità all'espianto degli organi nel donatore e nel follow up pre e post trapianto.

Il donatore

I criteri per la valutazione di idoneità del donatore (ultimo decreto 26.11.03) si basano su elementi forniti da anamnesi, rilievi clinici obiettivi, diagnostica strumentale e di laboratorio ed esami istologici e/o autoptici eventualmente suggeriti dai tre precedenti livelli di valutazione.

Le linee guida per l'accertamento della sicurezza del donatore di organi hanno lo scopo di definire i livelli accettabili/non accettabili per l'utilizzo degli organi e per stabilire le modalità operative del processo del rischio.

Cinque sono i livelli di rischio: *inaccettabile* (criterio

di esclusione assoluta), *aumentato ma accettabile*, *calcolato*, *non valutabile* e *standard*.

L'idoneità microbiologica e virologica all'espianto viene accertata in regime di emergenza. Il protocollo diagnostico comprendono la valutazione sierologia di HIV1/2 (anticorpi), HCV (anticorpi), HBV (antigeni e anticorpi), HDV (indispensabile nei pazienti HBsAg positivi), lue (VDRL, TPHA).

È inoltre necessaria (anche dopo il trapianto) la determinazione sieroimmunologica del donatore nei confronti di CMV, EBV, VZV, HSV1/2 e Toxoplasma g.; tali conoscenze sono indispensabili nel follow up post trapianto del ricevente.

Su tutti i donatori devono essere eseguiti esami colturali di sangue, urine, escremento ed essudati vari.

Si devono eseguire indagini biomolecolari supplementari, HIV-RNA e/o HCV-RNA e/o HBV-DNA, in tutti i donatori, per i quali, l'anamnesi, l'esame obiettivo o risultati di laboratorio, facciano emergere dubbi.

I criteri microbiologici e virologici di *esclusione assoluta* alla donazione degli organi sono: sieropositività per HIV1/2, contemporanea positività per HBsAg, anti-HBc ed anti-HDV, infezioni sistemiche sostenute da microrganismi per i quali non esistono opzioni terapeutiche praticabili, malattie da prioni accertate e, criterio non infettivologico, neoplasie maligne in atto.

Casi particolari:

Donatore con infezione da HCV:

- 1) il trapianto può venire eseguito in un ricevente negativo per anticorpi anti-HCV, solo in situazione di emergenza clinica comprovata.
- 2) Il trapianto è consentito in un ricevente positivo per anticorpi anti-HCV.

Donatore con infezione da HBV(HBsAg+):

- 1) il trapianto è consentito in un ricevente HBsAg positivo.
- 2) In un ricevente HBsAg negativo, sprovvisto di anticorpi verso il virus B o con anticorpi anti-HBsAb a titolo considerato protettivo (uguale o superiore a 10mUI/ml), il trapianto è consentito, solo per organi "salvavita", in pazienti in condizioni di emergenza cli-

nica comprovata.

Donatore con anticorpi IgG anti-core del virus B (HBcAb +), HBsAg negativo:

il fegato di questi donatori ha un rischio elevato (circa 50%) di trasmissione di epatite B al ricevente, pertanto nei donatori HBcAb positivi il trapianto è consentito, a favore di riceventi HBsAg positivi o HBsAg negativi ma vaccinati.

Il ricevente

Tutti i pazienti in attesa di trapianto devono essere sottoposti alla valutazione sieroinmunologica nei confronti degli herpesvirus (HSV1/2, CMV, EBV, HHV6,7,8, VZV), Toxoplasma g., Parvovirus B19, lue, virus epatite B e C ed HIV. Sono indicati controlli microbiologici trimestrali: coprocultura, urinocultura e ricerca nel tampone nasale di *Aspergillus* e *S.aureus* da ripetere al momento del trapianto.

I riceventi devono essere sottoposti a reazione di Mantoux 5 U PPD ed a vaccinazione anti epatite B.

Management del paziente candidato al trapianto di fegato per malattia da HBV: il trapianto per cirrosi da HBV è gravato da un elevato tasso di recidiva in assenza di profilassi (>90%), con alta morbilità e mortalità.

In questi pazienti si attuano programmi di prevenzione pre-post trapianto a base di antivirali allo scopo di sopprimere la carica virale e le recidive.

L'applicazione delle tecniche biomolecolari nel follow up pre-post trapianto ha modificato radicalmente la gestione clinica di questi pazienti dimostrando che il tasso di recidiva della malattia da HBV è direttamente correlato all'entità della replicazione di HBV prima del trapianto.

Management del paziente candidato al trapianto di fegato per malattia da HCV: la storia naturale dell'HCV dopo il trapianto è molto variabile, alcuni pazienti sviluppano viremia con minime alterazioni istologiche, altri severe forme di epatite sino alla cirrosi.

Le ragioni della variabilità della malattia da HCV dopo il trapianto rimangono poco chiare ma verosimilmente sono in relazione alle caratteristiche intrinseche del virus, a quelle geneticamente determinate nell'individuo ed all'influenza dell'ambiente o iatrogene (grado di immunosoppressione).

Follow up post trapianto degli herpesvirus: sono considerati la "rovina" della medicina dei trapianti in quanto, data loro estesa diffusione e la loro capacità di riattivare dai siti di latenza in condizioni di immunodepressione cellulo-mediata acquisita o farmacologica, possono minacciare la sopravvivenza stessa del paziente o dell'organo trapiantato.

Il citomegalovirus, il virus di Epstein-Barr, gli herpesvirus 6,7 ed 8 sono attualmente considerati come il maggiore fattore di rischio di complicazione infettiva nel post trapianto.

S5.3

PROBLEMATICHE BATTERICHE E FUNGINE NEI TRAPIANTI D'ORGANO

Andreoni S.

Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità, Novara

Le problematiche batteriche e fungine che di norma vengono affrontate da un Laboratorio di Microbiologia in merito alla eziopatogenesi, epidemiologia e terapia di episodi infettivi insorti in occasione di allotrapianti d'organo (rene, cuore, polmone, fegato, pancreas) e di tessuti (midollo osseo, osso, valvole cardiache, cute, cornea) sono state promosse, sin dagli albori di questa nuova disciplina, da non poche valutazioni che possono essere schematizzate in:

- i) *infettivologica*, a livello del donatore e del ricevente e di cui aggiornati protocolli di comportamento clinico-diagnostico;
 - ii) *cronologica*, rispetto all'epoca del trapianto e agli agenti infettanti;
 - iii) *microbiologica*, in funzione dell'isolamento e identificazione delle specie, con la possibilità di più episodi infettivi ad etiologia diversa in un singolo caso e di un singolo episodio ad etiologia mista (batteri, miceti, virus);
 - iv) *epidemiologica*, in funzione del materiale da esaminare (sangue, urina, cateteri, espettorato, lavaggio bronchiale, essudati);
 - v) *terapeutica*, in funzione degli antibiogrammi.
- Opportuna se non indispensabile, accanto a queste valutazioni, quella *sistemica* di ogni risultato in stretta collaborazione tra laboratorio e clinica.

S5.4

L'INFEZIONE DA BKV DOPO TRAPIANTO RENALE

Ginevri F., Comoli P., Azzi A.

Istituto di Microbiologia, Università di Firenze

I polyomavirus umani, BK e JC, sono virus a DNA circolare a doppia elica che, in seguito all'infezione primaria, rimangono latenti nelle cellule epiteliali dei tubuli renali, nei linfociti B e nel tessuto cerebrale (1). La manifestazione clinica dell'infezione è strettamente legata al grado di immunocompetenza dell'ospite. In particolare, la riattivazione dell'infezione da BKV nei soggetti trapiantati di rene è stata recentemente identificata come causa di nefropatia interstiziale (PAN) e di perdita di funzione renale (2-3). La malattia si presenta nel 2-5 % dei soggetti trapiantati, in media tra il 2°

e il 60° mese post-trapianto, e può causare la perdita dell'organo in circa il 45% dei soggetti affetti (1-3). Un'analisi retrospettiva, condotta dal nostro gruppo su una coorte di pazienti pediatriche, ha mostrato un'incidenza di infezione attiva da BKV pari al 26%, con nefropatia nel 5% dei soggetti, dati del tutto paragonabili a quanto osservato nei riceventi adulti (4). L'analisi dei fattori di rischio in questa casistica ha dimostrato un'associazione significativa tra infezione attiva da BKV e sieronegatività del ricevente pre-trapianto.

I pazienti con PAN mostrano un peggioramento della funzione renale con un quadro clinico difficilmente distinguibile dal rigetto o da altre patologie interstiziali. La presenza all'esame biptico di inclusioni virali nelle cellule tubulari renali e nelle cellule epiteliali glomerulari, unitamente all'identificazione del virus con analisi immunoistochimica, ibridazione in situ o con PCR genomica, evidenzia il ruolo patogenetico dell'infezione nel danno renale. La riduzione della terapia immunosoppressiva, unico presidio terapeutico in assenza di una terapia antivirale specifica di provata efficacia, aumenta il rischio di rigetto, inducendo un circolo vizioso dovuto alla necessità di potenziare nuovamente l'immunosoppressione.

Poiché il trattamento della nefropatia in atto non sembra modificare sostanzialmente la prognosi (5), potrebbe rivelarsi di grande utilità individuare indici predittivi del rischio di progressione verso la nefropatia, con lo scopo di attuare un trattamento dell'infezione virale attiva finalizzato a prevenire l'instaurarsi della nefropatia conclamata. I pazienti a rischio di sviluppare nefropatia da BKV vengono identificati dalla presenza di cellule con inclusi virali intranucleari nelle urine, tuttavia questa metodica ha un basso indice di predittività positiva (30%). È stato dimostrato che il dosaggio del DNA virale nel plasma è un metodo sensibile e specifico per identificare la nefropatia da BKV, e che, nella progressione da infezione virale attiva a nefropatia, il riscontro di viremia può precedere la diagnosi di danno d'organo (6-7). Inoltre, il nostro gruppo ha recentemente evidenziato come il mancato sviluppo di una risposta immune protettiva specifica per BKV possa concorrere alla progressione del quadro patologico (8). Al momento, sono in corso studi prospettici finalizzati alla definizione del ruolo di questi marcatori surrogati nella diagnosi precoce della PAN.

Considerata l'attuale assenza di studi clinici controllati sull'efficacia del farmaco antivirale cidofovir e della riduzione dell'immunosoppressione nel controllo della PAN (5, 9), risulta di primaria importanza sviluppare strategie terapeutiche alternative che consentano il controllo della replicazione virale in assenza di tossicità. L'immunoterapia T cellulare adottiva si è dimostrata di provata efficacia nel prevenire e/o trattare alcune infezioni virali nell'ospite immunocompromesso. La recente osservazione che l'immunità T cellulare ha un ruolo predominante anche nel controllo dell'infezione da poliomavirus JC (10) ha portato il nostro gruppo ad

ipotizzare la possibilità di applicare questa strategia nel contesto della nefropatia da BKV. A questo scopo, è stata delineata una procedura per la riattivazione in vitro e l'espansione di linee T citotossiche (CTL) autologhe BKV-specifiche da soggetti trapiantati di rene in terapia immunosoppressiva (11).

BIBLIOGRAFIA

1. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 611.
2. Nicleleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1080.
3. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, et al. Human Polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67: 103.
4. Ramos E, Drachenberg CH, Papadimitriou JC, et al. Clinical course of polyomavirus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2145.
5. F Ginevri, R de Santis, P Comoli, et al. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney allograft recipients: a single center analysis of incidence, risk factors and novel therapeutic approaches. *Transplantation* 2003; 75:1266-70.
6. Nicleleit V, Klimkait T, Binet IF, et al. Testing for Polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 2000; 342: 1309.
7. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK and nephropathy in renal transplant recipients. *N Engl J Med* 2002; 347: 488.
8. Ginevri F, De Santis R, Basso S, et al. Evaluation of risk for BKV-associated nephropathy after kidney transplantation by quantification of urinary BKV DNA and specific cellular immunity. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 426A.
9. Vats A, Shapiro R, Randhawa P, et al. Quantitation of BKV virus load in urine and serum and cidofovir therapy for the management of BK virus associated nephropathy in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003;75: 105.
10. Koralnik IJ, Du Pasquier RA, Kuroda MJ, et al. Association of prolonged survival in HLA-A2+ progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope. *J Immunol* 2002; 168: 499.
11. P Comoli, S Basso, A Azzi, et al. Dendritic cells pulsed with polyomavirus BK antigen induce ex-vivo BKV-specific cytotoxic T cell lines in seropositive healthy individuals and renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3197.

S5.5

ASPETTI PATOGENETICI E MONITORAGGIO CLINICO DELLE LINFOPROLIFERAZIONI EBV-CORRELATE DEL PAZIENTE TRAPIANTATO

Dolcetti R.

*Unità Operativa di Immunovirologia e Bioterapie.
Dip. della Ricerca Pre-Clinica ed Epidemiologica,
Centro di Riferimento Oncologico -
I.R.C.C.S., Istituto Nazionale Tumori, Aviano (PN).*

Le linfoproliferazioni post-trapianto (PTLD) EBV-correlate comprendono uno spettro di disordini iperproliferativi prevalentemente a carico dei linfociti B, che variano da condizioni benigne policlonali a quadri francamente maligni. Le alterazioni delle risposte immuni T cellulari nei confronti di EBV indotte dalla terapia immunosoppressiva sono alla base della complessa patogenesi dei PTLD. Ciò è sottolineato anche dai fattori di rischio che favoriscono lo sviluppo di tali disordini: la sieronegatività per EBV (in particolare in presenza di un donatore EBV-sieropositivo), lo sviluppo di un'infezione primaria da EBV (o riattivazioni occasionali del virus), elevati livelli di immunosoppressione farmacologica, presenza di malattia da CMV e la giovane età. Le evidenze finora ottenute indicano comunque che, oltre all'immunosoppressione, altri fattori sono necessari per lo sviluppo dei PTLD. Tra questi sembrano di rilevanza patogenetica alcuni fattori microambientali, quali la frequente presenza di un'abbondante infiltrazione di linfociti T CD4+, particolarmente delle forme ad insorgenza precoce, e l'elevata produzione locale di IL-6. Recentemente è stato inoltre dimostrato come concentrazioni fisiologiche di glucocorticoidi, ma non altri ormoni steroidei, promuovano direttamente la proliferazione di cellule B immortalizzate da EBV. Infine, alterazioni genetiche, in particolare a carico dei geni p53, c-myc e N-ras, sono state associate all'evoluzione di forme policlonali di PTLD verso quadri francamente monoclonali ed altamente aggressivi.

Nella maggior parte dei casi, le cellule di PTLD esprimono un pattern di latenza virale che comprende tutti gli antigeni della fase latente, mentre si ritiene che solo una piccola frazione di tali cellule presenti caratteristiche fenotipiche compatibili con una replicazione di EBV. Dato che l'espressione di alcuni oncogeni virali quali LMP-1 ed EBNA-2 è in grado di promuovere direttamente la proliferazione dei linfociti B, ciò spiega come l'EBV rivesta un ruolo diretto nella patogenesi del PTLD. Tuttavia, occorre sottolineare come l'espressione dei vari antigeni di EBV sia spesso eterogenea nell'ambito dello stesso caso, non essendo infre-

quente il riscontro di sottopopolazioni di cellule con pattern di latenza più ristretti. In tali casi, è probabile che siano intervenute alterazioni genetiche o epigenetiche in grado di rendere non più necessaria l'espressione di oncogeni virali per il mantenimento del fenotipo trasformato.

Il monitoraggio del carico del DNA di EBV nel siero/plasma o nelle cellule mononucleate circolanti dei pazienti trapiantati si è dimostrato un supporto molto utile ai fini predittivi e diagnostici, migliorando notevolmente la gestione clinica. Tuttavia, molto rimane ancora da fare in termini di standardizzazione delle metodiche di indagine utilizzate, ed in particolare per ciò che riguarda la tipologia e la quantità del materiale biologico di partenza, l'identificazione di standard quantitativi di riferimento e la definizione di valori soglia di significato clinico. Occorre inoltre sottolineare il fatto che elevati carichi di EBV non sempre sono indicativi dello sviluppo di PTLD e che tali linfoproliferazioni possono insorgere anche in assenza di un concomitante incremento della quantità del DNA di EBV circolante. Ciò suggerisce come la sola determinazione del carico di EBV non sia sufficiente a predire il rischio di PTLD. Appare quindi evidente come sia necessario integrare la quantificazione del carico di EBV con altri parametri, prevalentemente di natura immunologica, al fine di poter meglio valutare l'equilibrio dinamico esistente tra l'EBV e il sistema immunitario dell'ospite trapiantato. Ciò consentirà di definire con maggior precisione tempi, tipologie e modalità degli interventi terapeutici a livello del singolo paziente, particolarmente di quelli che prevedono l'infusione di linfociti T citotossici EBV-specifici.

S5.6

L'IMPORTANZA DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA NELLE STRATEGIE DI CONTROLLO DELLE INFEZIONI NEI PAZIENTI TRAPIANTATI D'ORGANO

Lazzarotto T.

*U.O. di Microbiologia, Laboratorio di Virologia,
Policlinico S.Orsola Malpighi,
Università degli Studi di Bologna, Bologna.*

Il trapianto d'organo è oggi l'unica cura che permette la sopravvivenza per patologie terminali a carico di organi vitali quali cuore, fegato, polmone e pancreas o il miglioramento della qualità di vita (trapianto di rene nei pazienti dializzati, di intestino per chi si nutre solo per via endovenosa).

Il rigetto e le infezioni sono i due principali e complessi fattori che condizionano l'evoluzione clinica del

trapianto, a breve e a lungo termine, e sono due processi intimamente associati e interdipendenti.

Il rischio di infezione nel soggetto ricevente l'organo è determinato dall'interazione tra l'esposizione a sorgenti infettive ambientali e lo stato funzionale del sistema immunitario, a sua volta frutto di un complesso equilibrio tra diversi fattori quali il tipo, la dose e la durata della terapia immunosoppressiva impiegata per il trattamento del rigetto, la comorbidità e la presenza di disturbi metabolici.

Le sorgenti di infezione possono essere di tipo endogeno, in particolare dovute al ruolo patogeno che possono assumere i microrganismi saprofiti presenti a livello della cute e mucose, e di tipo esogeno da ricercare nell'organo trapiantato, nella trasfusione di sangue ed emoderivati e nell'ambiente.

Le complicanze infettive si possono presentare a carico di vari organi ed apparati e la maggior parte di esse avvengono nei primi mesi post-trapianto. Gli agenti eziologici patogeni, sia convenzionali che opportunistici, sono prevalentemente di natura batterica (ad origine sia ospedaliera che comunitaria) e virale, ma per la loro gravità particolare attenzione viene anche data ad alcune complicanze fungine e protozoarie.

La diagnostica di laboratorio permette nella maggior parte dei casi di interpretare e orientare correttamente i segni e i sintomi che la medicina clinica e strumentale evidenzia nei pazienti.

Quindi la prevenzione, la diagnosi appropriata e tempestiva, unite ad una gestione ottimizzata delle complicanze infettive, costituiscono i principali obiettivi della medicina di laboratorio dei trapianti con la finalità di ridurre la mortalità non correlata a recidiva della malattia di base.

Con il progredire delle conoscenze e della ricerca nella diagnosi precoce e nella terapia precoce delle infezioni, l'intervallo tra l'espressione clinica di una malattia da infezione e la sua diagnosi si è gradualmente modificato a tal punto che la diagnostica di laboratorio si è resa indispensabile nell'ottenere informazioni circa i fattori di predittività per la comparsa di infezione e di malattia, i fattori per il controllo della progressione della malattia e quindi i fattori che permettano di controllare l'efficacia delle terapie o di rivelare precocemente l'eventuale insuccesso.

Il perfezionamento tecnico delle metodiche di laboratorio ha portato una vera e propria rivoluzione nei metodi diagnostici rendendo sempre più necessario migliorare le potenzialità della ricerca nel settore.

relazioni

SESSIONE 6

Le linfadenopatie infettive

Giovedì 10 giugno 2004, 9.00-13.00 Sala Carraresi

S6.2

LE LINFOADENOPATIE DA BATTERI E MICOBATTERI

Tronci M.

A.O. S. Camillo Forlanini, Microbiologia e Virologia

Con il termine linfadenite si intende l'ingrossamento e/o l'infiammazione dei nodi linfatici; con il termine linfadenopatia si intende una affezione dei linfonodi. Una linfadenopatia può essere limitata ad un linfonodo solitario o ad un gruppo localizzato di linfonodi che drenano una certa area anatomica e può essere monolaterale o bilaterale; a volte, nel corso di infezioni sistemiche, l'interessamento può essere generalizzato. I linfonodi sono normalmente palpabili nei bambini (non alla nascita), specie quelli cervicali, ascellari e inguinali. Il picco viene raggiunto intorno agli 8 – 11 anni per poi diminuire fino alla pubertà.

Le manifestazioni ed il decorso di una linfadenite possono essere ad andamento acuto, subacuto o cronico.

Una linfadenite può essere causata da:

- 1) moltiplicazione di cellule all'interno del linfonodo e tra queste linfociti, plasmacellule, monociti ed istiociti;
- 2) infiltrazione di cellule dall'esterno, e fra queste cellule maligne e neutrofili;
- 3) drenaggio da una sorgente di infezione attraverso i linfonodi.

Molti casi rappresentano una risposta ad infezioni benigne, localizzate o generalizzate, di origine virale, batterica, da miceti o da protozoi.

Linfadeniti acute: a seconda della natura del microrganismo infettante, delle capacità di difesa dell'ospite e della terapia antibiotica somministrata, l'infiammazione può progredire e presentare carattere suppurativo, non suppurativo o caseoso. Quando responsabili sono certi microrganismi sono evidenti alcuni segni

caratteristici quali:

- 1) necrosi caseosa (in caso di infezioni causate da *Mycobacterium tuberculosis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e da diversi micobatteri atipici);
- 2) ascessi granulomatosi (possono essere dovuti al linfogranuloma venereo e alla malattia da graffio di gatto);
- 3) iperplasia follicolare reattiva con grappoli disseminati di istiociti epitelioidi (può essere presente nella toxoplasmosi);
- 4) linfadenite granulomatosa necrotizzante (si manifesta nella tularemia e può ricordare quella dovuta alla malattia da graffio di gatto, ma spesso è presente una infiammazione granulomatosa più evidente);
- 5) linfadenite necrotizzante localizzata a livello dei linfonodi mesenterici (può essere causata da *Yersinia paratuberculosis* e *Y. Enterocolitica*).

Linfadeniti croniche: istologicamente è visibile una risposta proliferativa con iperplasia delle cellule reticoloendoteliali e seni linfatici dilatati e ripieni di mononucleati. Questo quadro non è specifico ma può essere presente in una grande varietà di infezioni ed anche in disordini di origine linfoproliferativa.

Per quanto riguarda le linfadenopatie ad origine infettiva causate da batteri e da micobatteri è possibile distinguere:

Linfadeniti acute, regionali, causate da batteri piogenici: La presenza di linfonodi palpabili non è sempre indice di malattia o infezione in atto, abbastanza comune è infatti un certo grado di linfadenopatia a livello inguinale ricordo di precedenti episodi di infezioni localizzate alle estremità. Al contrario deve essere guardata con grande sospetto una linfadenopatia presente in certe sedi e tra queste la preauricolare, retroauricolare, sopraclavare e pettorale.

Una linfadenite suppurativa è più comune nei bambini piuttosto che negli adulti e negli ultimi anni *Staphylococcus aureus* ha superato *Streptococcus pyo-*

genes come causa più frequente con interessamento di linfonodi presenti in sede sottomandibolare, retrocervicale, inguinale ed ascellare che si presentano palpabili, di almeno 3 cm di diametro e la cute sovrastante è calda, spesso eritematosa ed edematosa. Spesso si rileva presenza di febbre.

Linfadeniti acute, regionali, causate da altri batteri: una gran varietà di microrganismi oltre quelli piogenici può causare linfadeniti localizzate con manifestazioni variabili in certi casi dall'ascesso alla fistola. Tali infezioni si distinguono da quelle da piogeni a causa dell'andamento prolungato, l'assenza di dolore, la mancanza di una precedente infezione da piogeni e la presenza di indizi nella storia del paziente quali graffio di gatto, precedente tubercolosi e recenti rapporti sessuali a rischio, viaggi, tatuaggi e piercing.

- Nella malattia da graffio di gatto nel 90% dei casi sono presenti anticorpi anti *Bartonella (Rochalimaea) henselae*, è possibile rilevare sequenze di 16S rRNA di *B. henselae*, e possibile isolare *B. henselae* nel sangue del gatto sospetto; inoltre è possibile l'isolamento culturale del germe da linfonodi infetti di pazienti immunocompetenti con malattia da graffio di gatto. *Bartonella henselae* è un bacillo curvo gram negativo, piccolo, pleomorfo, ossidasi negativo, catalasi negativo, dipendente dal fattore X, cresce lentamente, richiede infatti da 2 a 6 settimane di incubazione in ambiente umido, arricchito con il 5% di CO₂, su piastre di agar sangue.

- Una linfadenopatia bilaterale in regione inguinale in uomo adulto è indicativa di malattia venerea, sifilide, LGV, HSV, che comunque presentano caratteri differenziali tra loro.

- La scrofula (linfadenite cervicale tubercolare) che negli anni passati era frequente sia nei bambini che negli adulti giovani, oggi è diventata rara. Oggi più frequentemente *M. scrofulaceum* è responsabile di scrofula nei bambini di 1 -3 anni, mentre negli adulti è più frequentemente in causa *M. avium*. *M. tuberculosis* può essere presente in pazienti immunocompromessi infetti da virus HIV.

Linfadeniti generalizzate associate a infezioni sistemiche: possono essere causate da una grande varietà di infezioni disseminate per via ematica. Una linfadenopatia generalizzata è una manifestazione caratteristica per esempio di sifilide secondaria, di infezioni da HIV, di mononucleosi infettiva, di leptospirosi e di tubercolosi miliare ed in genere è possibile evidenziare la presenza del microrganismo nei linfonodi.

Ovviamente riveste grande importanza la diagnosi differenziale delle varie linfadeniti ed a tale scopo possono essere messe in atto metodiche diagnostiche basate su metodi tradizionali e di biologia molecolare. La scelta del metodo diagnostico da seguire riveste una grande importanza nelle diverse situazioni e può fortemente condizionare il risultato della ricerca che deve essere quindi fondata su criteri di evidenza clinica, epi-

demologici, di EBM e darà risultati ottimali solo se basata su un lavoro di gruppo multidisciplinare.

S6.3

LINFOADENOPATIE AD EZIOLOGIA VIRALE

Ghisetti V.

Osp. Molinette, Lab. Microbiologia

La maggior parte delle linfadenopatie ha alla base cause benigne. L'origine infettiva rappresenta l'80% delle linfadenopatie al di sotto dei 30 anni di età, con una tendenza alla diminuzione con l'aumentare dell'età, al contrario, della eziologia neoplastica che in genere è bassa (1.1%) e aumenta con il passare dell'età.

Le linfadenopatie che costituiscono un impegnativo problema diagnostico sono quelle a carattere persistente (da almeno un mese) e che non rispondono ad un trattamento antibiotico empirico perché impongono di escludere due ipotesi eziologiche importanti e a prognosi completamente differente: quella neoplastica e quella virale.

L'eziologia virale è tipica dell'età pediatrica e giovanile. Ne sono responsabili virus linfocitotropici che infettano direttamente i linfociti e cellule del sistema immunitario oppure si tratta di linfadenopatie reattive a malattie esantematiche (parotite, rosolia, morbillo, varicella, ecc) o ad infezioni virali loco-regionali (del cavo orale, delle prime vie respiratorie, della sfera genitale, ecc).

I virus che infettano direttamente cellule del sistema linfatico sono i seguenti: il virus di Epstein Barr (EBV) che infetta i linfociti B, il Citomegalovirus (CMV) per monociti e progenitori midollari della serie bianca, l'herpes virus umano 6 (HHV6) e 7 (HHV7) per i linfociti CD4+, HIV e HTLV-1. EBV e CMV danno infezioni prevalentemente asintomatiche nell'età pediatrica, che esitano nel quadro della mononucleosi infettiva (MI) o in sindromi mononucleosi-like in popolazioni di giovani adulti non immuni. L'infezione da HHV6 nell'infanzia determina l'esantema subitum ma il virus è anche associato ad un quadro di linfadenopatia cervicale a carattere acuto e necrotizzante (sindrome di Kikuchi), che insorge in giovani adulti. Le linfadenopatie che hanno alla base infezioni delle cellule del sistema linfatico sono in genere associate ad una fase di viremia, breve e self-limited (EBV, CMV, HHV6) oppure elevata e duratura (HIV).

Adenopatie loco-regionali di tipo reattivo si determinano in corso di infezioni da virus herpes simplex 1 (HSV 1) e HSV 2, che interessano cute e mucose orali, congiuntivali e genitali; da Adenovirus respiratori e da altri virus respiratori (virus dell'influenza e parainfluenzali), che colpiscono le prime vie aeree; in corso

di varicella, parotite, rosolia, morbillo e di malattie esantematiche da virus Cocksackie B2. Nelle malattie esantematiche è presente una fugace fase viremica, che parte dai linfonodi loco-regionali e precede la comparsa dell'esantema.

La diagnosi differenziale tra i diversi agenti eziologici deve prevedere accuratezza nell'anamnesi e nell'esame obiettivo. Alcune localizzazioni sono più frequentemente associate ad un'etiologia infettiva, come la regione del collo e della testa (56% dei casi sono di origine infettiva), quella ascellare ed inguinale, mentre altre sono più facilmente associate ad un'etiologia neoplastica: le linfadenopatie sovraclavari sono maligne nel 54-85% dei casi, come quelle sistemiche o che colpiscono più di due stazioni linfonodali distinte, in pazienti HIV negativi.

Le indagini di laboratorio per identificare la causa della linfadenopatia devono essere ad ampio raggio e avere un carattere multidisciplinare, perché è necessario indagare sul versante ematologico, immunologico ed infettivologico. La valutazione morfologica dell'esame emocromocitometrico consente di identificare la presenza di forme tipiche della mononucleosi infettiva da EBV (linfociti grandi ed irregolari con abbondante citoplasma basofilo, di aspetto "atipico"), oppure di evidenziare un quadro di linfocitosi a piccoli linfociti con linfociti attivati, comune a molte virosi. Sul versante immunologico è presente un pattern immunofenotipico CD3+/CD8+ per incremento dei linfociti T citotossici, con talora inversione del rapporto CD4/CD8. Le indagini sierologiche per la ricerca degli anticorpi virus specifici hanno un ruolo fondamentale. La tecnologia del DNA ricombinante ha portato a test sierologici virus-specifici allestiti con antigeni virali rappresentativi di epitopi fortemente immunogeni, che hanno migliorato notevolmente la performance della diagnostica sierologica. Particolare rilievo hanno i test per le IgM virus-specifiche, segno di infezione recente (da 7-10 giorni) e i test che valutano la maturazione dell'avidità delle IgG virus-specifiche, che danno informazioni su quando c'è stato il contatto con il virus, elemento fondamentale se l'infezione è stata contratta in gravidanza. Lo studio delle proteine virali e della specifica risposta anticorpale ha prodotto Western blot che consentono di diversificare l'infezione primaria dalla riattivazione in base al pattern di reattività di tipo IgG e IgM.

Molto interessante è l'associazione tra infezione da EBV, estremamente diffusa nella popolazione umana, e sviluppo di tumori. Il virus come tutti gli altri virus erpetici, dopo l'infezione primaria instaura uno stato di latenza nell'ospite, che permane per tutta la vita. E' insita in EBV la capacità di trasformare i linfociti B e di essere all'origine di almeno tre tipi distinti di linfomi: linfoma B tipo Burkitt, linfoma di Hodgkin (LH) e sindromi linfoproliferative in pazienti sottoposti a trapianto. Questi tumori derivano dalla trasformazione delle cellule B del centro germinativo. Studi epidemio-

logici hanno calcolato un rischio relativo di 4.0 per i pazienti con MI di sviluppare LH EBV-correlati, in un tempo medio di circa 4 anni dall'episodio infettivo. Il tipo istologico associato all'infezione da EBV è a cellularità mista. Studi molecolari hanno identificato il genoma di EBV e suoi trascritti nel tessuto tumorale di circa un terzo dei LH, e direttamente nelle cellule di Reed Stenberg (RS) che sono il frutto di espansione non controllata di cellule B immature dei centri germinali. Due proteine del virus sembrano giocare un ruolo molto importante nell'induzione dei meccanismi di carcinogenesi a livello dei precursori dei linfociti B: LMP-1 e EBNA-2. LMP-1 si comporta come un membro della famiglia dei recettori del TNF e induce una attivazione costitutiva del network che fa capo a NF- κ B, con la conseguenza che sono attivati tutti i meccanismi di proliferazione cellulare e di inibizione dell'apoptosi. L'attivazione del sistema NF- κ B è caratteristica della cellula di RS. La seconda proteina che il virus utilizza per interferire con la proliferazione cellulare è EBNA-2 che è in grado di inibire i segnali di controllo del sistema Notch sulla proliferazione stessa, con il risultato di promuovere ulteriormente la proliferazione incontrollata dei linfociti B.

S6.4

LYMPHADENOPATHY ASSOCIATED WITH PARASITIC DISEASES

Peyron F.

Laboratoire de parasitologie et pathologie exotique. EA3732. Université Claude Bernard. Lyon 1.

Lymphadenopathy is common clinical finding caused by a wide range of diseases. Parasitic infections are responsible for wide spectrum of lymph nodes enlargement, ranging from acute to chronic and regional to generalised lesions

We will first consider parasitic diseases occurring in Europe then those occurring in tropical area. The later becoming a real concern for European doctors due to the increasing number of travellers and migrants.

Parasitic diseases encountered in Europe

-Toxoplasmosis. This infection which occurs throughout the world is caused by an intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. Human infection is acquired by ingestion of cysts in uncooked meat or soil contaminated vegetables. In immunodeficient subjects infection may be severe even lethal. When acquired during pregnancy *T. gondii* can cross the placenta and causes congenital disease. The incidence and the severity of fetal infection depends on when in pregnancy the mother gets infected.

In Immunocompetent patients this disease is asympto-

matic in 80% of cases, and acute infection passes unnoticed. In some cases, painless cervical lymphadenopathy sometimes accompanied by myalgia and fever is observed. The differential diagnosis essentially includes infectious mononucleosis and lymphoma. Definitive diagnosis relies on serological tests showing a profile of recent infection. When performed, lymph node biopsy shows follicular hyperplasia, granulomas are rarely seen. Immunohistochemical stains may identify the parasite. PCR could also be performed on biopsy.

-Kala-azar (visceral leishmaniasis). This disease caused by a flagellated protozoan is widely distributed in the Mediterranean basin but also in Brazil, East Africa, and Asia. Fever, from all types, is the major symptom associated with asthenia, anemia, splenomegaly, hepatomegaly and lymphadenopathy. Lymph node aspiration can be performed and material examined on a Giemsa stained smear. Intracellular amastigote forms are usually observed. Molecular diagnosis and culture on NNN medium can also be undertaken.

Parasitic diseases encountered in tropical area

-Onchocerciasis. This filariasis results from infection with *Onchocerca volvulus*. Distribution of the disease concerns Africa, Central and south America. Manifestations are pruritus, lichenified dermatitis, nodules resulting from tissue reaction around parasites, and eye lesions with a progression to blindness. Lymphadenopathy is frequent in inguinal and femoral area. Histopathology shows inflammation and fibrosis, with granuloma and eosinophilic reaction. Diagnosis depends on the detection of microfilariae on a skin biopsy.

-Loiasis. This filariasis, due to *Loa loa* is, in our experience, the most frequently imported filariasis observed in Europe. The disease occurs only in the forest area of central Africa. The typical clinical features are pruritus and Calabar swelling, ocular pain when adult worms pass under the conjunctiva of the eye. Enlarged nodes are rarely observed. Diagnosis is based on the presence of microfilariae in blood.

-Lymphatic filariasis, are present in Asia, America and Africa. Clinical features are fever with lymphangitis and lymph nodes enlargement. Lymphatic obstruction is followed by elephantiasis. Definitive diagnosis relies on the detection of microfilariae in blood or in hydrocele fluid.

-African trypanosomiasis (sleeping sickness). This emerging disease, caused by a flagellated protozoan, is observed in Africa. An hematogenous and lymphatic dissemination occurs in the first stage of the disease and is marked by fever. Moderate and painless cervical lymphadenopathy is frequently observed. Parasite can be isolated from blood or node aspiration and observed on Giemsa stained smear. When this work-up is positive, CSF examination is mandatory.

-American trypanosomiasis (Chagas disease) Clinical signs during the acute phase consist in fever malaise chagoma (erythema and swelling in the area where parasite had penetrated) and disseminated lymphadenopathy. Diagnosis requires the detection of parasite in blood or in nodes aspiration.

In conclusion, lymphadenopathy related to parasitic diseases is not frequently seen in routine practice. When observed in a patient returning from tropical countries it suggest first infectious diseases like tuberculosis or HIV infection.

S6.5

RUOLO DEL PATOLOGO NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE ETIOPATOGENETICA DELLE LINFOADENOPATIE DA AGENTE INFETTIVO

Bonoldi E., Cazzavillan S., Bevilacqua P.A., Ninfo V.

*U.O. Anatomia Patologica, H.S. Bortolo;
Vicenza, Anatomia Patologica;
Università degli Studi, Padova*

Il percorso diagnostico che conduce alla definizione etiopatogenetica di una linfoadenopatia da agente infettivo prevede la stretta collaborazione tra diversi specialisti, quali l'infettivologo, il microbiologo, il patologo clinico e l'anatomopatologo. La correlazione tra parametri e dati clinici, sierologici ed istopatologici consente per lo più di identificare l'agente infettivo responsabile del processo, rendendo così possibile l'adozione di una terapia mirata e, qualora si rendano necessarie, delle norme igienico-sanitarie atte ad evitare il diffondersi dell'infezione.

L'anatomopatologo dispone di una serie di strumenti diagnostici: in prima battuta la valutazione morfologica da effettuarsi su tessuto routinariamente fissato ed incluso, volta al riconoscimento di parametri e patterns istopatologici; in seconda battuta alcune metodiche di istochimica tradizionale, immunoistochimica, ibridazione in situ e biologia molecolare, volte alla identificazione dell'agente patogeno, mediante l'evidenziazione di proteine o l'amplificazione di geni.

E' così possibile, per l'anatomopatologo, effettuare una diagnosi di relativa certezza in alcuni processi infettivi quali, ad esempio, le micobatteriosi, la toxoplasmosi, la malattia da graffio di gatto, la mononucleosi ed alcune micosi.

Molto più numerose sono invece le infezioni che modificano la morfologia del linfonodo compromesso in modo aspecifico. Il ruolo del patologo può allora essere quello di orientare il clinico ed il microbiologo per

grandi categorie etiopatogenetiche: virus, batteri, miceti e protozoi.

Accanto ad una funzione più tradizionalmente diagnostica, al patologo dovrebbe essere anche affidata la responsabilità di un adeguato campionamento e di una corretta conservazione del tessuto linfonodale sospetto per patologia infettiva, tale da consentire l'esecuzione delle eventuali indagini ancillari che si dovessero rendere necessarie per la definizione del caso.

relazioni

SESSIONE 7

Il laboratorio di Microbiologia e il Bioterrorismo

Giovedì 10 giugno 2004, 14.45-16.45, Sala F

S7.1

LE NUOVE EMERGENZE: IL BIOTERRORISMO

¹Urbano P., ²Urbano F.

¹Dipartimento di Sanità Pubblica

- Sezione di Microbiologia, Università di Firenze

²Ispettorato R.F.C. dell'Esercito, Sezione Logistica

- Servizio Sanitario

Agenti biologici sono stati impiegati a scopo offensivo fin dagli albori della civiltà, e in tempi moderni lo si è fatto in modo scientifico, investendo grandi risorse nella loro preparazione e nello studio di modi per renderne l'uso più efficace e letale.

L'avanzamento delle conoscenze e il progresso scientifico hanno alimentato i 'progressi' di chi coltivava l'intenzione di usare gli agenti biologici come arma, e non è mancato chi non si è fatto scrupolo di usarli in modo delittuoso, sia contro bersagli definiti che come armi di distruzione di massa.

In reazione a tale uso la comunità internazionale ha bandito l'uso bellico degli agenti biologici, ormai considerato illegittimo dal diritto internazionale convenzionale. Per una trattazione più ampia delle basi storiche del bioterrorismo rimando alla relazione che segue.

Fin qui l'argomento è rimasto - o è sembrato rimanere - di competenza esclusiva di pochi specialisti, in campi alquanto separati: giuristi del diritto umanitario, militari dei nuclei di difesa Biologica-Chimica-Nucleare, ricercatori di qualche istituzione statale.

I più recenti sviluppi biotecnologici hanno fatto presagire, nella mente di qualche illustre scienziato, che le manipolazioni genetiche potevano offrire enormi potenzialità ai malintenzionati, fossero essi individui, sette, o Stati; ma gli allarmi che essi hanno lanciato sono rimasti a lungo inascoltati, fino a quando il bio-

terrorismo non è esploso come 'emergenza'.

Delineo qui i tempi dell'emergenza bioterroristica, cercando di individuarne le ragioni e soffermandomi su ciò che tale emergenza comporta, prescindendo dalle reazioni organizzative statuali e dalle implicazioni per i laboratori di microbiologia clinica, temi questi trattati in relazioni separate.

Usando la parola 'bioterrorismo' come chiave di ricerca in Medline il primo documento che si ritrova risale al 1996; anche nel 1997 se ne trova uno solo; diventano 8 nel '98, 39 nel '99, 70 nel 2000, 447 nel 2001, 865 nel 2002, anno di picco; le pubblicazioni indicizzate nel 2002 sono 721, quelle fin'ora indicizzate nel 2004 sono 30 [al 26 febbraio].

Sempre usando 'bioterrorismo' come chiave di ricerca, risultano ben 416 gli articoli pubblicati dal *Journal of Emerging Infectious Diseases*, la rivista che definisce e consacra le emergenze sanitarie in senso lato, che ha dedicato al bioterrorismo due interi numeri monografici.

Le ragioni che hanno dettato i tempi e l'intensità dell'emergenza sono di diverso tipo, e si intrecciano fra loro; la defezione di primari protagonisti dei programmi di guerra biologica dell'Unione Sovietica ha permesso ai servizi occidentali di conoscere e valutare l'importanza della minaccia, e li ha indotti a dare maggior credito all'allarme di scienziati del calibro di Joshua Lederberg. La cortina di segreto che ammantava le armi e gli armamenti biologici si è andata dissolvendo, per gradi o per strappi, come quello connesso col chiarimento definitivo delle cause dell'incidente di Sverdlovsk, o con la dimostrazione della natura bioterroristica delle attività, fin dagli anni '80, del culto Rajneeshee, e, fin dal 1990, della setta giapponese Aum Shinrikyo. La prima guerra del Golfo è stata condotta con la penosa consapevolezza dell'impreparazione delle truppe per fronteggiare l'eventuale uso dell'arsenale biologico che si sapeva nella disponibilità di Saddam. Più in generale, l'establishment statunitense si è reso conto dell'inadeguatezza del sistema di sanità pubblica - a lungo trascurato - per fronteggiare le

emergenze, quella bioterroristica *in primis*, mentre cresceva nell'opinione pubblica l'interesse e la paura per gli agenti biologici.

Fondamentale, per capire come si è andata gonfiando la percezione dell'emergenza, è il collocarla nel quadro geopolitico generale. La caduta del muro e la fine del bipolarismo ha reso chiaro che le armi biologiche non giovano alle grandi potenze, che dispongono del deterrente nucleare, e che hanno quindi tutto l'interesse a bandirle, e magari a collaborare fra loro per realizzare contromisure difensive. Ma i bandi non garantiscono molto: i trattati internazionali vincolano gli Stati – e c'è una lunga tradizione di non osservanza da parte di alcuni [i c.d. stati canaglia], e non toccano gli individui, o i gruppi, le sette, le organizzazioni criminali, per i quali le armi biologiche costituiscono un'opzione realizzabile, economica ed efficace.

Il bioterrorismo si era già qualificato come problema emergente quando l'11 settembre 2001 ha imposto il terrorismo *tout court* come la più pervasiva minaccia globale da fronteggiare.

Venendo alle implicazioni della nuova emergenza vanno indicati i grossi investimenti nella preparazione di piani per fronteggiarli, gli investimenti in ricerca e sviluppo di vaccini e in ricerche di base sui diversi agenti e sui loro meccanismi patogenetici, l'attenzione agli aspetti di contenimento del rischio biologico, la restrizione allo scambio di agenti biologici, l'acuirsi dell'intelligence specifica, l'enfasi nel raccomandare attività di formazione specifica per il personale sanitario e per il personale in prima linea. Conseguenza diretta dell'emergenza è la decisione di rinviare *sine die* l'eliminazione definitiva degli stocks legalmente riconosciuti di *Variola major*.

Alla periferia dell'"impero" noi risentiamo marginalmente l'emergenza del bioterrorismo, che non ci vede specificamente nel mirino; sentiamo la necessità di prepararci culturalmente al problema, ma realisticamente constatiamo l'impossibilità di organizzarci per essere pronti a fronteggiare un attacco reale, che avrebbe conseguenze gravi, e potenzialmente apocalittiche, anche per i popoli che possono investire enormi risorse economiche e tecnologiche.

S7.2

ALLE BASI DEL BIOTERRORISMO. UN APPROCCIO STORICO ALLA GUERRA BIOLOGICA

Urbano F.

*Ispettorato R.F.C. dell'Esercito, Sezione Logistica
- Servizio Sanitario*

Solo un approccio storico permette la piena comprensione d'argomenti complessi quali quelli costituenti

l'inscindibile binomio guerra biologica/bioterrorismo. Il numero di lavori pubblicati su riviste autorevoli è in aumento esponenziale; tuttavia tali argomenti non costituiscono ancora oggetto di trattazione sistematica né nei corsi di laurea di discipline sanitarie, né nei corsi post-universitari. Parimenti le strutture del Sistema Sanitario operanti sul territorio risultano solo parzialmente adeguate a rispondere alla minaccia: non ne sono state create a hoc e ci si è limitati a delegare la risposta ad altre già esistenti, non specializzate, spesso già oberate d'attività routinarie e sostenute da personale non specificamente preparato.

Definiamo la guerra biologica può essere definita come l'uso deliberato e intenzionale d'agenti biologici o di loro portatori o fomite per danneggiare un nemico; il terrorismo può essere designato come l'uso sistematico della violenza per condizionare società o governi nelle loro scelte politiche. Il bioterrorismo non è altro che una forma di terrorismo mediante l'uso o la minaccia dell'uso d'agenti biologici.

Se la storia del bioterrorismo è recente, quella della guerra biologica è antichissima; non si può comprendere il bioterrorismo senza conoscere la storia della guerra biologica, sia perché nella pressoché totalità dei casi gli agenti biologici utilizzati o ipotizzati in atti bioterroristici sono stati sperimentati, valutati, allestiti o ipotizzati per la guerra biologica, sia perché l'effetto psicologico dell'uso d'agenti biologici, perseguito dai terroristi, è il principale di quelli perseguiti in guerra sin dall'antichità, sia infine per il fatto che l'attuale prevalenza di conflitti molto asimmetrici nel corso dell'ultimo quarantennio ha reso assai meno certo il confine fra guerra biologica e bioterrorismo.

Già le prime fonti documentali storiche testimoniano l'utilizzo d'agenti biologici in guerra. L'utilizzo contro altri esseri umani d'agenti biologici è presumibilmente più antico delle prime fonti documentali stesse. Appare infatti plausibile che già alla fine della quarta glaciazione, i cacciatori magdaleniani, utilizzassero abitualmente veleni vegetali sulla punta delle loro armi acuminata.

Nell'evo antico è ben documentato l'uso di avvelenare o contaminare pozzi e acque superficiali, tanto che questa pratica è stata la prima ad essere proscritta nel diritto internazionale.

Nel periodo degli assedi sono le malattie infettive a determinare, spesso, le sorti dei conflitti, e non mancano esempi storici del ricorso a mezzi biologici – primo fra tutti quello del lancio di cadaveri di appestati in Caffa assediata, cui molti attribuiscono l'origine della pandemia di peste nera che imperversò in Europa fin dal 1343.

Passando ai tempi moderni, alcuni studi riportano che la guerra biologica ebbe un importante ruolo già nelle prime fasi di diffusione delle malattie infettive nel nuovo mondo, culminando con l'artata diffusione del vaiolo fra le tribù indiane.

L'età contemporanea ha visto il connubio fra scienza

moderna e guerra biologica, le atroci sperimentazioni sull'uomo e sul campo attuate dai giapponesi in Mancinoria, l'impiego di agenti biologici per delitti politici, l'attuazione di grandiosi programmi statali di produzione, sviluppo e sperimentazione di agenti con varia potenzialità letale e di mezzi per disseminarli efficacemente.

La reazione dell'opinione pubblica, e considerazioni geopolitiche e militari, hanno indotto i governi responsabili a bandire la guerra biologica, spostando l'attenzione sui mezzi per difendersi dall'impiego terroristico degli agenti biologici, che oggettivamente può rappresentare un'opzione attraente per individui, sette, culti, mafie – o per stati canaglia.

S7.3

BIOTERRORISMO E SANITÀ PUBBLICA: TRA EMERGENZA E ORGANIZZAZIONE

Bonaccorsi G., Olimpi N.

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

Nonostante le difficoltà tecniche proprie dell'utilizzo di agenti biologici, un attacco con armi batteriologiche, qualora si verifici, può provocare enormi conseguenze sulla salute pubblica sia in termini di impatto sanitario che, quale fattore di insicurezza e di terrore innescato nella popolazione generale, di impatto sociale.

A partire dai casi statunitensi di antrace dell'ottobre del 2001, l'attenzione da parte delle autorità sanitarie dei vari paesi verso tale potenziale minaccia è cresciuta in maniera esponenziale: tali eventi hanno, di fatto, imposto alla comunità internazionale e ai singoli stati di verificare l'esistenza e l'efficacia di piani di previsione, prevenzione e rapida risposta a questa emergenza e, contemporaneamente, di approfondire studi per la messa a regime di nuove strategie.

In ambito internazionale, la struttura di riferimento principale per tutti gli stati membri è costituita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità: spettano infatti ad essa la valutazione e la consulenza per il miglioramento dei programmi che ogni singola nazione deve elaborare per il controllo del proprio ambito territoriale. Il mandato internazionale conferito all'OMS in materia di bioterrorismo è stato definitivamente sancito nella 55^a Assemblea Mondiale della Sanità, tenutasi nel maggio 2002, durante la quale è stata approvata la risoluzione sulla "Risposta globale di Sanità Pubblica a un evento naturale, rilascio accidentale o uso deliberato di agenti biologici e chimici o materiale radionucleare che colpiscono la salute". La

strategia sviluppata dall'OMS include quattro aree prioritarie di intervento: in ambito sovranazionale, l'articolazione di una risposta coordinata e in grado di mutare aiuti e competenze laddove reperibili; le attività di vigilanza, sorveglianza e risposta globale; la preparazione di strategie all'interno dei singoli stati; la preparazione mirata per specifiche malattie e/o intossicazioni. Per ogni sezione sono stati elaborati programmi e linee-guida, alcune delle quali tuttora in evoluzione.

In materia di organizzazione e gestione di emergenze biologiche, un ruolo di primo piano tra le singole nazioni, sia in termini di ricerca e risorse dedicate, sia in termini di volontà politica, è stato ed è tuttora svolto dagli Stati Uniti, che nel gennaio 2002, nel corso del 107° Congresso dell'Unione, hanno approvato ed emanato uno specifico Atto per migliorare la capacità di prevenire, prepararsi e rispondere al bioterrorismo e ad altre emergenze sanitarie. In tale documento viene tracciato il quadro di riferimento all'interno del quale dovranno articolarsi le risposte di sanità pubblica, secondo schemi preordinati e pronti per l'uso.

Nell'ambito dell'Unione Europea, lo *Health Security Committee*, formato da rappresentanti dei Ministri della Salute di ogni Stato Membro, ha approvato, nel dicembre 2001, lo *Health Security Programme*, ovvero un programma di collaborazione reciproca e scambio di informazioni e aiuti tra le differenti autorità sanitarie dei vari paesi membri dell'UE. Dal maggio 2002, allo scopo di dare attuazione ad un programma di sicurezza sovranazionale, è stata costituita una *task-force* europea, la cui attività si focalizza su alcune priorità: istituzione di un sistema per il rapido scambio di informazioni e coordinamento delle attività connesse con il bioterrorismo; rapida identificazione di eventuali rilasci deliberati di agenti infettivi; valutazione, mediante un modello a matrice, dell'impatto di attacchi bioterroristici sui sistemi di Sanità Pubblica; gestione clinica e laboratoristica dell'emergenza.

In Italia, le iniziative condotte per fronteggiare le conseguenze dell'uso deliberato di agenti chimici e batteriologici si sono, fino ad oggi, articolate in tre *item*: gestione dell'emergenza; ricognizione delle risorse; elaborazione e divulgazione di un Piano Nazionale di Difesa che vuole proporsi come punto di riferimento per le successive fasi di pianificazione e realizzazione delle attività a livello territoriale.

In tale prospettiva, come specificato anche nel Piano Sanitario 2003-2005, se da un lato le strutture centrali si pongono come organo referente, decisionale e di coordinamento a livello nazionale, d'altra parte è richiesto ai singoli governi regionali, anche a seguito della modifica del Titolo V della Costituzione, di predisporre piani operativi locali, il cui ambito territoriale gestionale coincida con quello delle singole Aziende Sanitarie Locali.

In conclusione, le strategie di risposta dei paesi sviluppati possono oggi avvalersi, qualora si sviluppino cor-

rette sinergie politiche, sia di nuove capacità organizzative ed interventistiche, sia di moderni mezzi tecnologici; a tale riguardo stanno acquisendo un'importanza crescente i sistemi di mappatura satellitare (GIS), in grado di fornire immagini della distribuzione spaziale di risorse e strutture reperibili in caso di emergenza, dell'area geografica in cui insistano casi sospetti o confermati di malattia, della previsione di eventuali diffusi epidemiche, del controllo fine di possibili variabili spaziali.

S7.4

BIOTERRORISMO: IL RUOLO DEL LABORATORIO

M.R. Capobianchi, A. Di Caro, G. Ippolito

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

Principi generali. L'individuazione di una rete di laboratori di Microbiologia e Virologia in grado di eseguire una pronta e sicura identificazione di infezione da microrganismi potenzialmente utilizzabili come armi biologiche è una delle tappe fondamentali nella costruzione di un piano atto a fronteggiare gli attacchi bioterroristici. Tale piano avrebbe una potenziale applicazione anche nel controllo di infezioni non legate a rilascio intenzionale.

Secondo l'organizzazione adottata in molti paesi occidentali, tale rete è strutturata in maniera piramidale, e prevede laboratori di primo livello, con valenza locale, laboratori regionali e laboratori di riferimento nazionale. La differenziazione dei compiti permette una azione di filtraggio dei casi sospetti, ed una valutazione via via più specialistica, man mano che si sale di livello. In Italia, una simile organizzazione non è stata ancora formalizzata, anche se sono stati preparati piani generali per fronteggiare i casi più allarmanti. Tali piani, per la valenza trasversale che rivestono, sono al vaglio delle commissioni internazionali. In particolare, vi è una azione concertata a livello europeo ed a livello mondiale finalizzata, nei paesi che ne condividono gli obiettivi, ad uniformare ed armonizzare sia le procedure di laboratorio, sia le modalità di comunicazione. **Organizzazione.** I laboratori locali e regionali hanno il compito di procedere alla diagnosi differenziale, e comunque di operare una valida azione di filtro per evitare un eccessivo sovraccarico dei laboratori centrali. Il loro compito è comunque differenziato secondo la natura dell'agente biologico sospettato. Per ciò che attiene agli agenti batterici, le tecniche per la loro identificazione, oltre a prevedere di norma livelli di biosicurezza medio-bassi (BL2 e BL3), sono abbastanza diffuse nei laboratori locali e/o regionali, consentendo una pressoché completa opera di filtraggio dei casi,

con accentramento a livello nazionale solo dei test di conferma e tipizzazione. Per quanto riguarda gli agenti virali a più alto potenziale bioterroristico (classe A), per la diagnosi specifica è richiesta la manipolazione dei campioni in laboratori ad livello di biocontenimento 4 (BL4). I sistemi diagnostici utilizzati generalmente non sono prodotti dall'industria, e pertanto non sono disponibili per l'utilizzo nei laboratori periferici; inoltre la pericolosità degli agenti implicati richiede strutture per il trasporto e l'isolamento dei pazienti, anch'esse di difficile reperimento a livello locale. Per fronteggiare queste difficoltà, si è ipotizzato di centralizzare, presso un centro di riferimento virologico nazionale, sia le procedure di diagnosi eziologica, sia l'eventuale ricovero del paziente, dopo che apposite *équipes* infettivologiche locali abbiano effettuato una preliminare valutazione della consistenza del sospetto. I laboratori locali o regionali sono comunque implicati nella eventuale diagnosi differenziale, basata su metodi facilmente reperibili sul mercato e standardizzati, in quei casi che arrivino alla attenzione del laboratorio senza una adeguata e preventiva valutazione, come potrebbe verificarsi in caso di attacco bioterroristico non dichiarato. E' pertanto cruciale una attività di informazione e formazione finalizzata a sensibilizzare gli operatori di laboratorio, ed a creare un sistema di comunicazione e di allerta prontamente mobilizzabile in caso di necessità.

lettura magistrale

Giovedì 10 giugno 2004, 17.00-18.00, Sala Carraresi

LM.1

HOW DO BACTERIA MINIMIZE THE BIOLOGICAL COST OF ANTIBIOTIC RESISTANCE?

Courvalin P.

Unité des Agents Antibactériens, Institut Pasteur, Paris, France.

Bacteria can become resistant to antibiotics following mutations in house keeping genes or acquisition of foreign DNA. In both instances, resistance generally imposes a cost to the fitness of the bacteria. Since microorganisms are subjected to the principle of parsimony, they have developed various ways to minimize the biological cost of resistance at the individual or population (community) level. The majority of the resistance determining mutations engender some fitness cost that is likely to be diminished by the occurrence of back or compensatory mutations. Gene fusion and integrons represent alternative approaches to limit the resistance cost by lowering gene expression. Inducible expression of resistance, at the transcriptional or translational level, is a common and efficient way to minimize the burden of resistance. Combinations of mutations in resident or acquired genes also allow genetic flexibility because of the possibility of reversion. The ultimate example of energy saving in the bacterial community is provided by inducible transfer of resistance genes following selective pressure by target antibiotics. These various possibilities will be exemplified in both, Gram-positive and Gram-negative bacterial pathogens, with antibiotic classes used to treat severe human infections.

LM.2

MICROBIOLOGY IN EUROPE : INITIATIVES FROM THE EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (ESCMID)

Struelens M.

Microbiology Dpt. Erasme Hospital-Université Libre de Bruxelles, Brussels Belgium.

Infectious disease diagnosis and management constitutes an increasingly complex challenge for health care systems. At the same time, advances in information technology, automation and molecular biology provide new tools. Constraints on health expenditure are prompting initiatives to review current practice with a view of cost-effectiveness. Within Europe, a variety of specialist services and organisational models have developed for diagnostic laboratories, infectious disease clinical services and infection control and prevention programmes. This diversity creates difficulties in building international surveillance, alert and response systems, which can be addressed in part by harmonisation of methods, quality assurance and accreditation. On the other hand, rising awareness of the global threat of emerging infectious diseases, including those caused by drug resistant microorganisms, is promoting the will for international co-operation, as indicated by the EU decision to launch the European CDC next year.

Efforts are made to strengthen and harmonise the training of health professionals in this field and develop models for effective infectious disease management and prevention. As the leading European organisation in the infection and medical microbiology fields, ESCMID provides a platform for the interaction of key players in academia, health care, regulatory and

public health agencies, national and European organisations, industry and media. The Society acts as a partner in defining the health targets, developing models of best practice, promoting excellence in science and providing training opportunities. The public health challenges from infectious diseases and their implications for healthcare services were discussed during an ESCMID workshop in Leuven, Belgium in March, 2004. The workshop was attended by 70 delegates representing 28 countries, including participants and contributors from the WHO, European Commission and UEMS. Recommendations were made to strengthen the interface of the infection disciplines with public health and benchmark health care services' performance. The current core training programme developed by the respective UEMS Sections for Infectious Diseases and Medical Biopathology, Microbiology Commission, was considered adequate. To warrant free movement of specialists and similar quality of care across Europe, core training curricula should be similar in all members states. The official recognition of medical microbiology should be supported in all countries. ESCMID contributes a strong post graduate training programme (thematic courses and laboratory workshops), to approximately 300 health professionals a year. Its Study Groups develop international studies and provide technical guidelines in various fields, such as antibiotic resistance surveillance. Its annual ECCMID congress offers opportunity of scientific exchange to over 5000 microbiologists and infection specialists. ESCMID is actively contributing to harmonisation of microbiological standards such as antibiotic resistance breakpoints and detection methods through its EU-supported European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). In the future, we consider essential to reinforce our co-operation with national specialist societies through our European Council to foster professional and scientific excellence in microbiology and infectious diseases.

relazioni

SESSIONE 8

Nuovi argomenti in Micologia e in Parassitologia

Venerdì 11 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala D

S8.1

MICETI E MICOSI EMERGENTI: EPIDEMIOLOGIA E CLINICA

^{1,3}Farina C., ^{2,3}Lombardi G.

¹UO Microbiologia, AO 'Ospedale San Carlo Borromeo', Milano;

²Laboratorio di Microbiologia, Ospedale di Circolo e Università dell'Insubria, Varese;

³Comitato per lo Studio della Micologia (CoSM)

Le infezioni fungine sistemiche sono da molti anni riconosciute come alcune delle complicanze opportunistiche più severe che colpiscono i soggetti a rischio.

Nel corso degli ultimi decenni si è assistito ad un notevole aumento dell'incidenza di tali infezioni, dovuto a diversi fattori predisponenti, tra i quali possiamo ricordare le malattie onco-ematologiche, l'infezione-malattia da HIV, i trapianti d'organo solido e di midollo osseo, le ustioni, la prematurità.

Inoltre, l'avvento di nuovi e più efficaci protocolli terapeutici ha portato ad un notevole aumento dell'aspettativa di vita dei soggetti immunodepressi, esponendoli però ad un maggiore rischio di contrarre infezioni opportunistiche.

L'ambiente stesso deve essere considerato come una potenziale sorgente di infezione, soprattutto in caso di lavori di ristrutturazione o di costruzione nei pressi o all'interno degli stessi Reparti di degenza.

I lieviti rappresentano i più comuni agenti di patologie umane di natura micotica, tuttavia si è notato un notevole cambiamento, poichè *Candida albicans*, che una volta era ritenuta responsabile dell'80-90% delle infezioni, è scesa al 60% circa, mentre è notevolmente aumentata la percentuale di isolamenti di specie non *albicans*. Anche i pattern di sensibilità ai farmaci antifungini sono cambiati, perchè alcune specie hanno nel

tempo sviluppato resistenze nei confronti di alcuni farmaci antimicotici: a tale proposito è opportuno ricordare che, a causa di queste resistenze, l'identificazione di un ceppo lievitoforme solo a livello di genere (ad es., *Candida* spp.) deve essere considerata inaccettabile.

Tra i miceti filamentosi *Aspergillus* spp. rimane il microorganismo di più frequente riscontro nelle infezioni umane: oltre alle forme tipicamente invasive (aspergilloma, aspergillosi polmonare ed extrapulmonare) non può tuttavia essere ignorata la capacità di estrinsecazione clinica proteiforme, di cui la sindrome polmonare allergica è la manifestazione clinica più evidente. Se il quadro clinico delle micosi sembra essersi modificato negli ultimi decenni, anche dal punto di vista strettamente eziologico si è registrato l'emergere di casi di micosi causate da altri ifomiceti (sia jalinii che dematiacei), quali *Fusarium*, *Scedosporium*, *Exophiala*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Mucor*, la cui identificazione almeno a livello di genere è fondamentale per indirizzare il clinico verso un trattamento appropriato. L'emergere dell'opportunità comporta oggi l'opportunità di valutare con attenzione ed in modo strettamente interdisciplinare l'isolamento di miceti caratteristicamente tellurici, considerandone i dati biologici alla luce del quadro clinico e di quello anamnestico.

Dal punto di vista della gestione clinica importanti evoluzioni debbono essere considerate degli autentici successi del progresso scientifico applicato alla microbiologia clinica ed alle malattie infettive: si considerino, da un lato, la standardizzazione dei tests di chemioantibioticosensibilità proposta (per talune molecole e per taluni miceti) da NCCLS e, dall'altro, lo sviluppo di nuove molecole o la disponibilità di nuove formulazioni di molecole che continuano a rappresentare il *gold standard* per la terapia antifungina.

Infine, è interessante notare che anche l'ambiente di lavoro o quello domestico possono essere responsabili di patologie ad eziologia fungina: negli Stati Uniti, ad esempio, sono già numerosi i casi segnalati di quella

che viene chiamata “*sick building syndrome*”, dovuta all’inalazione di conidi (soprattutto di *Stachybotrys* spp.) da parte di persone che vivevano in ambienti pesantemente contaminati da questo micete. Alcuni ceppi di questo micete sono in grado di produrre micotossine molto potenti, che possono causare gravi disturbi e, in alcuni casi, portare a morte.

S8.2

LA BIOLOGIA MOLECOLARE IN MICOLOGIA

¹Faggi E., ²Andreoni S.

¹Dipartimento di Sanità Pubblica

- Sezione Microbiologia, Università di Firenze

²Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità, Novara

La biologia molecolare, nell’ambito della micologia medica, può essere impiegata sia a scopo diagnostico che epidemiologico.

In campo diagnostico le biotecnologie possono essere utilizzate per la ricerca dei miceti direttamente nel materiale patologico permettendo di arrivare ad una diagnosi più rapida rispetto all’impiego delle metodiche classiche (esame colturale) e si possono rivelare particolarmente utili nella diagnosi di micosi profonde quali aspergillosi, candidosi, criptococchi, istoplasmosi, pneumocistosi.

La PCR è la metodologia più ampiamente impiegata. Essa può essere utilizzata in combinazione con altre tecniche (PCR-ELISA, PCR-Restriction Enzyme Analysis ecc) o non in combinazione (semplice PCR, Nested PCR). I primers sono per lo più ricavati da sequenze di geni nucleari codificanti per proteine, sequenze di regioni ITS del DNA nucleare, sequenze rDNA nucleare, sequenze rDNA mitocondriale. La varietà di metodologie e la varietà di primers ha portato però a risultati non sempre ben confrontabili; inoltre un international consensus (Clin. Infect. Dis. 2002, 34, 7-14) sconsiglia l’impiego della PCR per la diagnosi di aspergillosi a causa delle false positività e di metodi commerciali non standardizzati. Nuove prospettive si aprono con l’impiego della real-time PCR.

In campo epidemiologico la biologia molecolare può essere utilizzata per identificare e tipizzare stipiti funghi.

A partire dagli anni ‘80, con il presupposto che l’identificazione del genoma corrisponda alla identificazione di uno stipite, ha trovato un sempre più vasto favore la tipizzazione genotipica. Da allora, diversificazioni intraspecie tali da consentire una biotipizzazione genotipica sono state ottenute fondamentalmente: 1) mediante cariotipizzazione, a seguito di separazione elettroforetica in campo pulsante di molecole di DNA di grandezza cromosomica; 2) ponendo in evidenza e

confrontando bande elettroforetiche di frammenti di DNA-ribosomale e di DNA-mitocondriale ottenuti con l’impiego di endonucleasi (DNA-polimorfismo da enzimi di restrizione); 3) mediante ibridizzazione con sonde DNA o RNA e, più recentemente, mediante 4) PCR fingerprinting e 5) sequenziamento genomico.

I differenti approcci metodologici, le finalità degli indirizzi di ricerca, l’avvento di nuove tecnologie, rendono difficoltoso un inquadramento di questi sistemi di tipizzazione, così come eventuali correlazioni o confronti.

La validazione di un sistema di tipizzazione dovrebbe prevedere una valutazione delle prestazioni in base ai criteri di tipizzabilità, riproducibilità, stabilità, potere discriminante, nonché costo, rapidità e facilità di esecuzione. Nel considerare e selezionare il marcatore molecolare ottimale andrebbero attentamente considerati anche i concetti di spazio e tempo. Questi criteri dovrebbero essere valutati ogni volta che una nuova metodologia viene applicata o vengono modificati i parametri in un protocollo sperimentale.

S8.3

IL MONITORAGGIO DELLA TERAPIA ANTIFUNGINA

¹Manso E., ²Fazii P.,

¹Sezione di Microbiologia, Laboratorio di Analisi. Azienda Ospedaliero Universitaria. Ospedali Riuniti Umberto I°, G.M. Lancisi, G. Salesi. Ancona

²Sezione di Microbiologia, Laboratorio di Analisi. Ospedale Civile S. Spirito, Pescara

Dal 1970 il tasso di infezioni fungine è aumentato significativamente, in associazione con diversi cambiamenti nella pratica clinica (estensione delle terapie immunosoppressive, frequenza dell’uso di antibiotici ad ampio spettro a volte in modo indiscriminato, utilizzo di cateteri intravascolari) e con la comparsa dell’AIDS.

Inoltre, stanno diventando sempre più comuni le infezioni fungine opportunistiche da funghi resistenti agli antifungini. I test di laboratorio eseguiti con i farmaci antifungini servono a determinare la minima concentrazione del farmaco necessaria ad inibire lo sviluppo *in vitro* di un particolare fungo o per misurare le concentrazioni dell’antifungino nel siero dei pazienti in terapia. Gli agenti antifungini usati comunemente nel trattamento delle infezioni superficiali (ad es. nistatina e griseofulvina) non richiedono monitoraggio di laboratorio. Un grosso sforzo è stato eseguito per sviluppare metodi standardizzati, riproducibili e clinicamente rilevanti per studiare la suscettibilità dei funghi ai farmaci antifungini. La resistenza antifungina comprende nell’attualità l’emergenza di specie resistenti natural-

mente (come *C. krusei*) e la resistenza progressiva, dovuta ad alterazioni delle strutture o funzioni cellulari bersaglio degli antifungini, in pazienti sottoposti per tempi lunghi a questi farmaci (AIDS, trapiantati di midollo osseo).

La terapia delle candidosi può essere oggi guidata dai test di suscettibilità in vitro. I test di suscettibilità a *Candida* sono particolarmente utili quando si tratta di ceppi di *Candida non-albicans* isolati da infezioni profonde, soprattutto se i pazienti sono stati già trattati con azoli. Nelle vaginite complicate il test di suscettibilità al fluconazolo è inutile: 1) perché sono rari i ceppi di *C. albicans* resistenti, 2) perché non esiste una correlazione tra fallimento terapeutico e suscettibilità all'antifungino e 3) perché le specie non-*albicans* non devono essere trattate con fluconazolo e frequentemente rispondono invece all'acido borico o alla 5-fluorocitosina topica.

Per i lieviti, negli USA, il NCCLS ha sviluppato la metodologia di microdiluizione in brodo, descritta nel documento M27-A2 (2002), e più recentemente la disco-diffusione al fluconazolo nel documento NCCLS M44-P (2003). In Europa l'EUCAST (2002) ha descritto un metodo di microdiluizione in brodo, escludendo il test per l'amfotericina B (AMB), con alcune varianti rispetto al M27 (micropiastre a fondo piatto, inoculo maggiore, aggiunta del 2% di glucosio) e che presenta alcuni vantaggi rispetto al NCCLS, come la riduzione del tempo di incubazione per la maggior parte delle specie a 24 h e conseguente riduzione del fenomeno di trascinamento. Breakpoints interpretativi per *Candida* spp (non per *Cryptococcus* spp) sono stati segnalati per 5-fluorocitosina, fluconazolo e itraconazolo, ma non per l'AMB. La metodica NCCLS non è in grado di differenziare i ceppi resistenti da quelli sensibile all'AMB, e sembra che le metodiche in agar diluizione come l'Etest abbiano una maggiore potenzialità. Comunque la maggior parte delle *Candida* isolate rimangono suscettibili all'AMB anche se alcuni ceppi di *C. glabrata* e *C. krusei* richiedono la massima dose di AMB. La concordanza tra le metodiche NCCLS e altri metodi commerciali è in genere elevata con la metodica colorimetrica Yeast-One® e l'Etest®. Diversi studi di test di suscettibilità comparativa sono stati eseguiti anche con i nuovi triazoli (voriconazolo, posaconazolo e ravuconazolo) e con le echinocandine, in particolare con caspofungina. La determinazione della concentrazione minima inibente della caspofungina (lettura ad inibizione completa) presenta ancora problemi tecnici e risulta talvolta difficile da determinare con le metodiche in brodo.

I test di suscettibilità per alcuni funghi filamentosi sono descritti dal NCCLS nel documento M38-A (2002) con metodica di microdiluizione in brodo. Sono in corso studi comparativi con metodiche commerciali.

Le concentrazioni nel sangue dei farmaci antifungini vengono misurati per due ragioni: per assicurare una

adeguata concentrazione del farmaco e per evitare concentrazioni che possano causare effetti collaterali indesiderati. Le metodiche utilizzate per misurare le concentrazioni dei farmaci antifungini più precise si basano nella determinazione dei singoli antifungini, anche in presenza di terapia combinata, mediante high-performance liquid chromatography (HPLC) e risulta particolarmente importante quando si esegue la terapia con itraconazolo orale o con gli altri azoli (fluconazolo, voriconazolo) in associazione con farmaci che interagiscono con loro.

S8.4

SIEROLOGIA DELLE ASCARIDIASI LARVALI

Petithory J.C.*, Cutrupi V.

*Gonesse, Francia; Tione, Italia

Nell'ascaridiasi umana da *Ascaris lumbricoides* i vermi divengono adulti nell'intestino e la diagnosi viene posta con la scoperta delle uova nelle feci.

Questa parassitosi è praticamente scomparsa nei paesi industriali, ed è in diminuzione nei paesi in via di sviluppo poiché le misure igieniche (eliminazione delle feci nelle latrine) hanno avuto notevole successo.

Diverse specie di nematodi facenti parte della superfamiglia ascaridoidea (Anderson) continuano ad infestare l'Uomo dopo ingestione di uova larvate.

I parassiti non raggiungono lo stadio adulto e le larve sono all'origine di diverse patologie. La difficoltà di trovare le larve e di identificarle ha portato allo sviluppo della diagnostica sierologia che risulta molto complessa per le parentele antigeniche tra i nematodi.

Le toxocarasi sono, attualmente, le più frequenti ascaridiasi larvali. Sono sostenute per i due terzi dei casi da *Toxocara canis* e per un terzo da *Toxocara cati*, rari casi sono dovuti a *T. vitulorum*. E' necessario utilizzare diversi antigeni Escretori - Secretori larvali per raggiungere la diagnosi della specie in causa, mediante immunoelettroforesi e/o immunoblot. Le larve di *Toxocara* sp. Dopo aver migrato nell'organismo s'incistano e rimangono vive per molto tempo fornendo una sierologia positiva per almeno 30 anni. I cuccioli dei cani vengono trattati (albendazolo, fenbendazolo, tiabendazolo...) a 2 e a 8 settimane dalla nascita ciò porterà alla scomparsa della toxocarasi canina negli anni prossimi. Tra i gatti il trattamento farmacologico meno frequente e le facili reinfezioni causano il persistere della parassitosi.

Baylisascaris procyonis nematode dell'orsetto lavatore è all'origine nell'Uomo di frequenti e gravi infestazioni del sistema nervoso in America e recentemente in Europa (Germania). Le numerose larve permettono la loro scoperta ma la diagnosi è solo sierologica.

Porrocaecum ensicaudatum ascaride degli uccelli, merli in particolare, è cosmopolita. E' spesso ritrovato nell'intestino dei giovani merli. Abbiamo ottenuto delle reazioni sierologiche positive in immunoelettroforesi con antigene larvale in un paziente oligofrenico di Arco (TN).

Anisakis simplex, ascaride del pesce parassita nel 50 - 90 % le aringhe, gli sgombri, i merluzzi ed è all'origine di patologie intestinali gravi ma rare nell'Uomo. La diffusione degli antigeni nella carne dei pesci provoca frequentemente fenomeni orticarioidi nell'Uomo dopo il consumo. La sola dimostrazione sierologica mediante immunoblot può evidenziare l'etiologia parassitaria. Le specie di ascaridi parassiti dei roditori, uccelli, pesci... non possono essere trattati negli animali ospiti saranno quindi le ascaridiasi del futuro.

S8.5

I TESTS RAPIDI NELLA DIAGNOSTICA PARASSITOLOGICA

¹Gatti S., ²Scaglia M.

¹Laboratorio di Parassitologia, Servizio di Virologia, IRCCS San Matteo, Pavia

²Dipartimento di Malattie Infettive, Università - IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Con il progredire delle conoscenze scientifiche, anche nell'ambito delle infezioni-infestazioni parassitarie, oltre che per vari altri microrganismi, si è manifestata sempre più imperativamente la necessità di disporre di nuove metodologie diagnostiche in grado di affiancare o addirittura sostituire tecniche convenzionali, rappresentate nella maggior parte dei casi in parassitologia dall'identificazione microscopica diretta del patogeno o dall'isolamento culturale dello stesso. I principali requisiti che devono o dovrebbero contraddistinguere questi nuovi approcci diagnostici sono semplicità e rapidità di esecuzione, elevata sensibilità e specificità ed, eventualmente, costi contenuti.

In effetti, da qualche tempo sono stati messi a punti e disponibili anche in commercio vari tests diagnostici rapidi principalmente per malaria, leishmaniosi, amebosi, giardiosi e criptosporidiosi.

Malaria - Le più recenti tecniche diagnostiche rapide comprendono la microscopia in fluorescenza, i test immunocromatografici su "strip" di nitrocellulosa ed i test biomolecolari. L'utilizzo della microscopia in fluorescenza è stata proposta come metodo alternativo all'osservazione microscopica classica dello striscio di sangue periferico; vengono utilizzati allo scopo alcuni coloranti fluorescenti che presentano una spiccata affinità per gli acidi nucleici cellulari. I fluorocromi maggiormente utilizzati sono l'arancio di acridina (test

Quantitative Buffy Coat, QBC; test di Kawamoto) e la benzotiocarbossipurina; essi hanno una lunghezza d'onda di eccitazione di 490 nm ed emettono entrambi una fluorescenza verde mela. Sono metodiche relativamente rapide e semplici oltre che dotate di ottima sensibilità e specificità, sovrapponibili in questo all'esame microscopico su goccia spessa. In particolare la sensibilità in infezioni con parassitemia < 100 parassiti/μl varia tra 41 e 93%; la specificità nelle infezioni da *P.falciparum* è eccellente (> 90%), mentre per le altre specie malariche si è rivelata decisamente inferiore (circa 50-52%). Gli svantaggi sono rappresentati da: necessità di apparecchiature dedicate (centrifuga da microematocrito, microscopio a fluorescenza); aspecificità del fluorocromi; impossibilità di effettuare con sicurezza diagnosi di specie in tutti i casi.

I tests immunocromatografici "a cattura" per determinanti antigenici specifici sono in grado di rilevare anche parassitemie più basse di quelle valutabili microscopicamente e sono completabili in non più di 10-15 minuti. I determinanti specifici che vengono ricercati con queste tecniche sono un antigene proteico (cosiddetta proteina ricca di istidina-2; HRP-2), idrosolubile e specifico di *P.falciparum*, e l'enzima lattico-deidrogenasi (pLDH), presente in isomeri distinti per le 4 specie plasmodiali interessanti la patologia umana. Tali antigeni sono prodotti sia dalle forme asessuate che sessuate dei parassiti malarici. I tests di II e III generazione in questo campo hanno migliorato la loro sensibilità e presentano un valore limite di identificazione paragonabile a quello di un esperto microscopista (100-200 parassiti/μl). I limiti, soprattutto per i test che vanno a rilevare HRP-2, sono rappresentati da: specificità dell'Ag per *P.falciparum*, quindi incostante rilevazione in caso di infezione da plasmodi non-*falciparum*; persistenza di HRP-2 nel sangue circolante dopo negativizzazione emoscopica a seguito di terapia specifica. In compenso le cross-reazioni con fattore reumatoide che erano una costante o quasi con i tests di I generazione, non costituiscono più problemi legati a false positività.

Un altro approccio diagnostico innovativo per le infezioni malariche è rappresentato dall'identificazione di sequenze nucleotidiche specifiche per *Plasmodium* spp. Sono state sviluppate svariate tecniche in PCR e sono stati proposti differenti "target" specifici, quali il gene codificante per la sub-unità 18S rRNA, per la proteina circumsporozoitica, ecc. Il vantaggio maggiore di queste tecniche biomolecolari è rappresentato dalla estrema sensibilità: il limite di rilevazione è di circa 5 parassiti/μl con il 100% di specificità. Le problematiche in questo caso sono legate alla necessità di disporre di locali idonei, di personale esperto ed al costo delle indagini stesse.

Leishmaniosi - Metodi rapidi e relativamente "nuovi" per la ricerca di *Leishmania* spp. comprendono la ricerca del protozoo nel citocentrifugato da sangue periferico, specie se sono in causa pazienti immuno-

compromessi, ed i test immunocromatografici. Il citocentrifugato è una tecnica di facile esecuzione, non invasiva e dotata di buona sensibilità e specificità; per questi motivi può essere utilizzato come screening preliminare per i soggetti con sospetta leishmaniosi viscerale ed anche nel follow-up post-terapeutico.

Per quanto riguarda l'evidenziazione di anticorpi specifici, il test immunocromatografico che sfrutta l'antigene ricombinante K39, derivato da una sequenza altamente conservata evidenziata originariamente in *L.chagasi* (oggi sinonimo di *L.infantum*), ma comune anche a *L.donovani*, si è rivelato sensibile (86-100%) e specifico (82-100%), con alcune limitazioni legate soprattutto a false negatività in soggetti HIV-positivi, e a differenti gradi di sensibilità correlati all'epidemiologia di *Leishmania* spp.

I test in PCR su sangue periferico si sono dimostrati estremamente sensibili e specifici sia su pazienti normoergici che ipoergici.

Amebosi – Nell'ambito delle infezioni da *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* le tecniche diagnostiche laboratoristiche si sono arricchite in questi anni di tests immunocromatografici ed immunoenzimatici in grado di evidenziare direttamente dal campione fecale il complesso delle 2 specie "gemelle" ed anche di identificare specificamente la sola *E.histolytica* patogena. Tali tests si basano sull'impiego di anticorpi monoclonali contro determinanti antigenici di superficie (lectine, serine ecc.), presenti in *E.histolytica*. Il limite principale di queste tecniche è rappresentato dal fatto che gli Ag rilevabili sono patrimonio delle sole forme vegetative, non delle cisti. Per tale motivo la % di sensibilità del test si abbassa notevolmente nei portatori asintomatici di *E.histolytica*, nelle cui feci sono solitamente presenti solo forme cistiche.

Le tecniche in PCR hanno avuto un notevole sviluppo anche nell'ambito delle infezioni amebiche, anche se i tests biomolecolari effettuati su materiale fecale risentono della presenza di numerosi inibitori.

Giardiosi e criptosporidiosi – Anche per queste infezioni protozooarie intestinali sono state messe a punto metodiche diagnostiche rapide - evidenzianti antigeni di superficie - quali tests di immunofluorescenza diretta, tests immunocromatografici ed immunoenzimatici su campioni fecali freschi o congelati. La sensibilità e specificità di queste tecniche si sono rivelate decisamente elevate in molti studi epidemiologici.

In conclusione, le tecniche di diagnosi rapida rappresentano un valido apporto metodologico nell'ambito di molte infezioni parassitarie; tuttavia in alcuni casi, segnatamente le infezioni malariche e le leishmaniosi, non possono essere ancora considerate un'alternativa assoluta ai metodi diretti, anche se può risultare utile il loro utilizzo ad integrazione dei protocolli diagnostici convenzionali. Per contro, in riferimento alle patologie parassitarie intestinali, tali nuovi tests si segnalano come possibile alternativa sensibile e specifica ai metodi tradizionali.

S8.6

INDAGINI MOLECOLARI AVANZATE PER LA DIAGNOSI DI LABORATORIO DI INFEZIONI DA PROTOZOI

Calderaro A.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio,
Sezione di Microbiologia, Università di Parma.

Diverse indagini molecolari avanzate si stanno dimostrando sempre più utili nella diagnosi di laboratorio di infezione da microrganismi patogeni di interesse medico, quando opportunamente affiancate a quelle tradizionali, dirette (microscopia, coltura) e indirette, (ricerca di anticorpi specifici). In questo studio verranno presentati, a titolo esemplificativo, i risultati ottenuti presso il nostro laboratorio durante la messa a punto, validazione e applicazione di indagini molecolari avanzate alla diagnosi di laboratorio di infezioni sostenute da protozoi di interesse medico (*Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, plasmodi della malaria, *Toxoplasma gondii*).

Infezioni da *E. histolytica* e *E. dispar* - Nel nostro laboratorio la diagnosi di infezione da *E. histolytica* viene correntemente effettuata mediante metodo tradizionale (esame colturale ed esame microscopico) affiancati da una reazione di amplificazione genica (PCR "rRNA-ssu") rapida, sensibile e specifica. Soltanto grazie all'uso del metodo molecolare sono stati diagnosticati alcuni casi di amebiasi che altrimenti sarebbero stati misconosciuti: nel primo caso, è stato dimostrato il DNA di *E. histolytica* nell'aspirato da ascesso epatico di un paziente con addome acuto e appendicite complicata di incerta eziologia; in un secondo caso, il DNA del protozoo è stato evidenziato in prelievi biotici della mucosa colica di un paziente contemporaneamente al DNA di batteri enteropatogeni (*B. pilosicoli* e *B. aalborgi*) dimostrando, per la prima volta in assoluto, una coinfezione da ameba e spirochete intestinali. Inoltre, con questo metodo molecolare è stato possibile identificare *Entamoeba dispar*, ameba intestinale non patogena e morfologicamente indifferenziabile da *E. histolytica*, isolata in coltura e/o osservata in preparati microscopici diretti da campioni di feci di pazienti con sospetta parassitosi intestinale.

Infezioni da plasmodi della malaria (*P. falciparum* (P.f.), *P. vivax* (P.v.), *P. malariae* (P.m.) e *P. ovale* (P.o.)) - Una reazione di amplificazione genica (nested-PCR specie-specifica, 18S rDNA) per la diagnosi di laboratorio di malaria, utilizzata nel nostro laboratorio da circa 5 anni a fianco delle indagini tradizionali e valutata su 443 campioni di 325 pazienti, si è rivelata più sensibile e specifica dell'esame microscopico, soprattutto nei casi di bassa parassitemia, e ha consentito di diagnosticare infezioni miste altrimenti

non rivelabili. Inoltre, da circa 1 anno è in uso quotidiano nel nostro laboratorio la real-time PCR ("18S rDNA"), valutata per *Plasmodium spp.* e per *P.f.*, *P.v.* e *P.o.* su 163 campioni di sangue da pazienti con sospetta malaria, che si è rivelata sensibile, specifica, rapida, di semplice esecuzione. Per i notevoli vantaggi offerti da questo sistema, esso ha sostituito la nested-PCR per l'identificazione di *P. spp.* e dei tre plasmodi *P.f.*, *P.v.* e *P.o.* e attualmente, la reazione nested-PCR è in uso esclusivamente per la ricerca e identificazione di *P. malariae*. La disponibilità di tali metodi molecolari avanzati ha consentito di organizzare in modo proficuo il flusso di lavoro. In particolare, la real-time PCR eseguita parallelamente all'esame microscopico e ad un saggio immunocromatografico rapido per la ricerca degli antigeni di plasmodi su tutti i campioni pervenuti in laboratorio per sospetta malaria, permette in un tempo rapido (3 ore) e con un costo di 30-40 Euro per reazione, di ottenere una conferma del risultato microscopico soprattutto nei casi critici (bassa parassitemia, infezioni miste).

Infezioni da *T. gondii* - Solo grazie all'uso di una reazione di amplificazione genica (nested-PCR specie-specifica, "gene B1") è stato possibile diagnosticare un caso di toxoplasmosi cerebrale in un paziente immunodepresso con sierologia di dubbia interpretazione e sospetta toxoplasmosi all'esame istopatologico e di escludere l'infezione in altri casi di sospetta toxoplasmosi congenita. La nested-PCR viene vantaggiosamente impiegata (su campioni di liquido cefalo-rachidiano, sangue periferico e materiale biotico), infatti, nel nostro laboratorio per la diagnosi di toxoplasmosi in quei casi in cui i metodi indiretti (sierologia) sono poco affidabili come può accadere nei soggetti immunocompromessi oppure per porre una diagnosi prenatale (liquido amniotico).

In conclusione, la descrizione di tutti questi casi vuole soprattutto richiamare l'attenzione sul ruolo fondamentale che hanno assunto le indagini molecolari nel Laboratorio di Parassitologia Clinica grazie alle quali è possibile effettuare una rapida e corretta diagnosi utilizzando anche campioni biologici per i quali le indagini parassitologiche tradizionali potrebbero fornire risultati non interpretabili (esempio campioni prelevati durante o dopo le somministrazioni di terapia antiparassitaria, campioni prelevabili in quantità ridotta non sufficiente per indagini tradizionali).

relazioni

SESSIONE 9

Biotechne emergenti nella diagnostica microbiologica e virologica

Venerdì 11 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala F

S9.1

APPLICAZIONI DELLA GENOMICA IN VIROLOGIA

Barzon L., Palù G.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova

Con il sequenziamento del genoma di molti patogeni, le tecniche di analisi genomiche mediante DNA microarray e sonde molecolari si stanno dimostrando un valido strumento per l'identificazione e la tipizzazione dei microorganismi, per lo studio della loro fisiologia, dei fattori di virulenza, e delle interazioni con l'ospite, nonché per l'identificazione di nuovi bersagli molecolari per farmaci antivirali. Abbiamo applicato metodiche di analisi di farmacogenetica e farmacogenomica per lo studio del profilo di espressione genica in campioni biotici di pazienti affetti da infezione da HIV-1, HCV, o HBV e sottoposti a terapia antivirale allo scopo di identificare geni coinvolti nella risposta alla terapia o nella manifestazione di eventi avversi. Più in particolare, per quanto riguarda i pazienti con infezione da HIV-1, abbiamo analizzando il tessuto adiposo sottocutaneo prelevato da pazienti affetti o non affetti da lipodistrofia e sottoposti a terapia anti-retrovirale HAART. Abbiamo dimostrato che alcuni geni codificanti per citochine prodotte da tessuto adiposo (adiponectina, resistina, TNF- α , leptina), per i recettori degli estrogeni e per l'aromatasi sono differenzialmente espressi nel tessuto lipodistrofico rispetto al tessuto adiposo sano e sono modulati dagli inibitori delle proteasi. Abbiamo inoltre dimostrato che i farmaci antiretrovirali provocano complesse alterazioni del pattern di espressione dei geni cellulari in un modello *in vitro* di differenziazione da preadipociti in adipociti. Per quanto riguarda l'infezione da virus dell'epatite, abbiamo applicato la tecnologia dei DNA microarray

allo studio di un'ampia casistica di tessuti epatici, ottenuti da pazienti con epatite cronica e/o epatocarcinoma correlati ad infezione da HBV o HCV e trattati con terapia medica. Questa analisi ci ha permesso di evidenziare i geni probabilmente implicati nella patogenesi della malattia, nella risposta alla terapia medica, o potenziali nuovi target terapeutici. Anche in questo caso, in modello cellulare *in vitro* viene impiegato per confermare i risultati osservati nei campioni clinici.

S9.2

PYROSEQUENCING: PRINCIPLES AND APPLICATIONS

Lundeberg J.

Dept of Biotechnology, AlbaNova University Center, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

As the complete genome sequence for a number of bacteria, higher organisms and humans are determined there is an emerging need for analysis of sequence variations as genetic markers in diagnosis, in cancer research and in pharmacogenomics. In order to meet this need, cost-effective, high-throughput and accurate techniques are required. For this reason the research activities at our department have developed two types approaches, a liquid based sequencing method, pyrosequencing and an microarray-based sequencing method, AMASE. Pyrosequencing is a non-gel based sequencing by synthesis method that interrogates the DNA sequence in an iterative manner. Successful incorporation of a nucleotide (A, G, C or T) into a DNA sequence template is measured in real-time by an enzymatic cascade that yields quantitative amounts of light that is measured by a CCD camera. The removal of nucleotides between cycles is achieved by the presence of apyrase that degrades non-incorporated nucleotides.

The microarray based method, AMASE, takes advantage of some of the components in the pyrosequencing concept but performs the assay on a microarray format and uses fluorescent nucleotides to identify genetic variations. The two formats complement each other by facilitating both a highly accurate systems as a well as high throughput system. The majority of the steps of these two methods are now automated using robotic systems developed in-house at the KTH Genome Center and here I will exemplify the use of these two principles in bacterial gene sequence analysis, monitoring of drug resistance and viral genotyping.

S9.3

SENSIBILITÀ AI FARMACI DEL MICOBATTERIO TUBERCOLARE: APPROCCIO GENOTIPICO CON L'IMPIEGO DI MICROCHIP

Tortoli E.

*Laboratorio di Microbiologia e Virologia-
Ospedale di Careggi, Firenze*

Con il diffondersi del fenomeno delle multiresistenze la determinazione della sensibilità del bacillo tubercolare ai farmaci è diventata una necessità imprescindibile. I tempi occorrenti sono tuttavia lunghi, tanto che, anche utilizzando le tecnologie più aggiornate, non sempre è possibile disporre dei risultati prima di quattro settimane. L'approccio genotipico alla determinazione della sensibilità ai farmaci trova pertanto nei micobatteri un campo di applicazione privilegiato. Il limitato numero di farmaci disponibili per la terapia della tubercolosi potrebbe far pensare ad una strategia non troppo complessa, senonché, a causa della presenza di più di un meccanismo di resistenza per ciascuno di essi, il numero di marker genetici da monitorare risulta comunque elevato. L'unica eccezione è costituita dalla rifampicina dal momento che le resistenze nei suoi confronti sono associate, in oltre il 97% dei casi, a mutazioni all'interno del gene *rpoB*. Per gli altri farmaci la proporzione dei ceppi resistenti contrassegnati dallo stesso marker genetico non supera in nessun caso il 60% ed emblematico è il caso dell'isoniazide per la quale, a differenti meccanismi di resistenza, si associano mutazioni che coinvolgono almeno tre diverse regioni geniche. La necessità di monitorare un elevato numero di geni, ciascuno dei quali con un ampio spettro di possibili mutazioni, ha di fatto reso fin'ora utopistico (eccezione fatta per la rifampicina per la quale è disponibile anche un kit commerciale) l'obiettivo della determinazione a livello genotipico delle resistenze del bacillo tubercolare. La tecnologia dei microarray, aprendo la possibilità di monitorare

simultaneamente un elevato numero di mutazioni grazie all'impiego di altrettante sonde apre una prospettiva nuova. I vari modelli di array e le possibili strategie di impiego saranno oggetto di discussione.

S9.5

TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE REAL-TIME NELLA DETERMINAZIONE DELLA CARICA VIRALE: PARVOVIRUS B19 E PAPPILLOMAVIRUS UMANI

Gallinella G.

Università di Bologna

Il recente sviluppo delle tecniche di PCR real-time quantitativa ha consentito di ampliare considerevolmente la rilevanza diagnostica della determinazione della presenza di acidi nucleici virali in un campione clinico. Infatti, alla semplice determinazione qualitativa della presenza di un virus, si è affiancata la possibilità di una determinazione quantitativa del carico virale, che a sua volta consente di definire con maggiore precisione il ruolo patogenetico del virus nelle diverse situazioni cliniche. Come modelli applicativi, tecniche di PCR real-time possono essere utilizzate per la ricerca e valutazione quantitativa di parvovirus B19 e papillomavirus umani.

La diagnosi virologica di infezione da parvovirus B19 è prevalentemente rivolta alla ricerca degli acidi nucleici virali nel sangue, come dimostrazione della fase viremica dell'infezione, nei tessuti, come dimostrazione della presenza ed espressione del virus, e infine nei fluidi e tessuti fetali per dimostrare un'avvenuta infezione intrauterina. La determinazione quantitativa del carico virale fornisce informazioni che possono meglio definire il quadro clinico in rapporto alla fase di infezione, se acuta, recente oppure persistente. Inoltre, la determinazione quantitativa del carico virale presente in unità di sangue destinate ai servizi trasfusionali, oppure di plasma per la produzione di emoderivati, costituisce un'efficace misura profilattica per impedire la trasmissione di infezioni iatrogene.

Il monitoraggio in tempo reale della quantità di prodotto di amplificazione è ottenuto mediante sistemi ottici in grado di rivelare la fluorescenza emessa da un fluorocromo intercalante (SybrGreen), oppure della fluorescenza emessa da fluorofori legati a sonde oligonucleotidiche che assicurano un riconoscimento specifico dell'amplificato (sonde FRET, TaqMan, Molecular Beacons). La valutazione quantitativa si basa sulla determinazione della fase lineare dell'accumulo di prodotto seguita dalla determinazione per ciascuna reazione di un ciclo soglia, correlato alla quantità di bersaglio iniziale. I metodi di calibrazione della

determinazione quantitativa mediante real-time PCR assumono particolare rilevanza nel caso del parvovirus B19. La determinazione quantitativa può essere ottenuta mediante una serie di standard di numero di copie bersaglio, che consente la costruzione di una curva di calibrazione esterna e quindi la quantificazione del campione per interpolazione sulla curva di taratura. In maniera più corretta, si può fare riferimento a sistemi di calibrazione che utilizzano bersagli di riferimento interni, amplificati da coppie di primer diverse rispetto alle coppie che amplificano il bersaglio virale, ottenendo un sistema di quantificazione relativa ad un campione noto che funge da calibratore. Infine, un bersaglio competitore può essere coamplificato in una reazione di PCR e rivelato in real-time se il sistema è in grado di rivelare contemporaneamente l'emissione luminosa di diversi fluorofori.

Per quanto riguarda la ricerca del DNA di papillomavirus umani mediante tecniche di PCR, le informazioni possono riguardare la presenza del DNA virale, la sua genotipizzazione, la determinazione della carica virale e la eventuale definizione dello stato di integrazione nel genoma cellulare. Le tecniche maggiormente in uso prevedono l'amplificazione mediante l'utilizzo di primer di consenso, seguita da un riconoscimento degli amplificati mediante sonde genotipo-specifiche, che permettono una tipizzazione virale, importante perché correlata ad un diverso rischio di sviluppo di lesioni neoplastiche. Una PCR real-time quantitativa che utilizza primer di consenso per numerosi genotipi fra quelli a maggior rischio oncogeno, è quindi in grado di fornire informazioni sia sulla presenza del DNA virale, sia sulla carica virale, indicativa del rischio di progressione neoplastica della lesione. Una genotipizzazione è quindi possibile sia mediante l'uso di primer che di sonde genotipo-specifiche. L'ulteriore aspetto di rilevanza riguarda il possibile stato integrato del genoma virale per alcuni genotipi ad alto rischio oncogeno, evento implicato nella progressione delle lesioni pre-neoplastiche a carcinomi invasivi. In questo caso le tecniche di PCR real-time possono fornire informazioni quantitative riguardo al rapporto numerico fra genomi virali allo stato episomiale rispetto allo stato integrato.

relazioni

SESSIONE 10 - Comune AMCLI-SIBioC

Il laboratorio nella Encefalopatia Spongiforme

Venerdì 11 giugno 2004, 10.00-13.00, Sala C

S10.2

OLFACTORY INVOLVEMENT IN HUMAN AND ANIMAL TSEs

Zanusso G.

*Dept. of Neurological and Visual Sciences,
Section of Clinical Neurology,
University of Verona, Verona Italy*

Olfactory system involvement is frequently observed in both human and animal affected with TSEs. We observed in 52 sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease cases that olfactory system is invariably involved and that PrP^{Sc} is deposited along the olfactory pathway. More interestingly, PrP^{Sc} was found at the level of cilia and basal cells of the neuroepithelium, located in the nasal vault and thus easily sampled for biopsy (Zanusso et al. NEJM 2003). We extended the study to nasal biopsies and so far we obtained nasal biopsy from three patients with probable sCJD. All cases showed PrP^{Sc} deposition in basal cells and more faintly at the level of cilia of the neuroepithelium. Controls with Alzheimer's disease, Parkinson's disease and corticobasal degeneration were negative for PrP staining (Tabaton et al. Ann Neurol 2004).

Concerning animal TSE, in chronic wasting disease olfactory system is mainly affected in both free ranging and in captive animals. Recently, we have shown that olfactory system represents a brain area where a consistent PrP deposition is observed in cattle affected with a novel form of amyloid-associated BSE (BASE). Aim of our studies is to detect whether olfactory system might represent a potential tissue for intravital diagnostics in humans and animals.

S10.3

STRATEGIE PER IL CONTROLLO DELLE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI ANIMALI IN ITALIA

Mulinelli F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

La crisi della BSE ha chiaramente evidenziato le debolezze del sistema europeo nell'affrontare emergenze sanitarie di tale portata. Come in altre crisi sanitarie, anche in questo caso si è faticato a gestire gli eventi e a prendere decisioni tali da evitare sia l'aggravarsi delle situazioni, sia il diffondersi di atteggiamenti dettati dal panico. Viene presentata una sintesi delle strategie di sorveglianza passiva ed attiva applicate dai Servizi Veterinari per il controllo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili animali in Italia a partire dalla comparsa dell'epidemia del Regno Unito ad oggi, in funzione dell'evoluzione delle conoscenze scientifiche e delle disposizioni normative emanate. Già nel 1990 il Ministero della Salute aveva proceduto ad attivare un sistema di sorveglianza passiva diretto a verificare ed a migliorare le capacità diagnostiche della rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. La BSE e la scrapie sono state inserite fra le malattie soggette a denuncia a partire dal 1991. Dal novembre del 2000 tutti gli stati dell'Unione Europea hanno deciso di adottare misure comuni tese al controllo ed alla eradicazione della BSE dai propri allevamenti. Questo si è concretizzato nel Regolamento (CE) 999/2001 recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili. Con il Decreto 7 gennaio 2000 è stato definito il "Sistema nazionale di sorveglianza epidemiologica della encefalopatia spongiforme bovina (BSE)". Nel gennaio 2001 ha avuto inizio il piano di sorveglianza

attiva, mediante metodiche innovative (Decisione 2000/374/CE e più recentemente Regolamento (CE) 1053/2003), diretto ad identificare la presenza della BSE in animali, al di sopra dei 30 mesi di età, regolarmente macellati, e a rischio, morti in azienda e con sintomatologia di tipo neurologico. Il limite di età è stato successivamente abbassato a 24 mesi. Va ricordato che le metodiche utilizzate consentono di ottenere la risposta del laboratorio entro tempi molto brevi, a differenza del passato, compatibili con le esigenze di conservazione e commercializzazione delle carni. Il piano di sorveglianza nazionale della scrapie è stato attivato nel 2002 a seguito dell'entrata in vigore del Regolamento (CE) 270/2002. Dal 2 gennaio 2001 all'1 marzo 2004, in Italia sono stati effettuati 2.136.320 test rapidi per BSE e dal 2002 ad oggi 84.074 per scrapie. Questo sistema di sorveglianza attiva ha permesso di rilevare 118 casi di BSE. A tutt'oggi sono stati invece diagnosticati 146 focolai di scrapie. Quale altra misura fondamentale è stata individuata la rimozione, in fase di macellazione, del materiale specifico a rischio (SRM): intesi come testa, inclusi occhi e cervello, tonsille, colonna vertebrale e midollo spinale, per bovini e ovicaprini di età superiore ai 12 mesi, nonché intestini, dal duodeno al retto, per i bovini di tutte le età, e milza e ileo per gli ovicaprini di tutte le età. A tutt'oggi, si ritiene infatti che in questi organi sia concentrata l'infettività e quindi che una loro precoce eliminazione sia sufficiente a proteggere il consumatore. Ulteriori verifiche della contaminazione da parte di materiale specifico a rischio potranno essere effettuate in sede di macellazione secondo quanto previsto dal Regolamento (CE) 1139/2003. Ancora il divieto dell'utilizzo di proteine animali per l'alimentazione dei ruminanti e successivamente di tutti gli erbivori, nonché l'attivazione di un programma nazionale di controllo in questo settore ha permesso di approfondire le conoscenze in questo settore e di evidenziare l'utilizzo di componenti non più autorizzati fin dal 1994. Nel 2002 è iniziato anche il piano di sorveglianza nazionale della scrapie basato anch'esso sull'utilizzo dei test rapidi eseguiti su animali regolarmente macellati o morti, nonché sintomatici, di età superiore a 18 mesi. Accanto alla sorveglianza attiva della scrapie e sulla base delle esperienze già maturate in altri stati europei (Regno Unito, Germania, Francia), l'Unione Europea ha legiferato così da rendere possibile l'attivazione di piani di eradicazione della scrapie basati sulla selezione genetica degli ovini nei confronti della suscettibilità a questa malattia (Regolamento (CE) 260/2002, Decisione 2002/1003/CE, Decisione 2003/100/CE). Anche la normativa che regola il trattamento dei rifiuti derivanti dalla macellazione e dall'attività diagnostica veterinaria, nonché delle misure di sicurezza da adottare per garantire la sicurezza degli operatori, è stata riconsiderata alla luce degli eventi connessi alle TSE, in particolare attraverso il Regolamento (CE) 1774/2002 "Gestione dei sottoprodotti di origine animale non

destinati al consumo umano" e più recentemente con il D.M. 16 ottobre 2003 "Misure sanitarie di protezione contro le encefalopatie spongiformi trasmissibili". Si sottolinea infine l'importanza di una corretta comunicazione delle strategie e delle misure adottate per il controllo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili animali, considerata l'importanza che le stesse hanno acquisito negli ultimi anni sia come patologia specifica dei ruminanti sia per gli aspetti zoonotici della BSE.

S10.4

INFLUENCE OF POLYMORPHISMS OF THE PRP GENE ON THE PATHOGENESIS OF TSE IN SHEEP

Agrimi U.

*Department of Food Safety and Animal Health,
Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

The dramatic epidemic of bovine spongiform encephalopathy (BSE) along with the description in humans of the variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) caused by the BSE agent, have demonstrated the importance of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) for animal health and - for the first time - the zoonotic potential of some TSE agents. The experimentally-confirmed susceptibility of small ruminants to the BSE agent and the possibility of its unrecognised circulation within European sheep and goats populations, have further led health Authorities to reconsider the risks related to animal TSEs directing their the attention also to TSE of sheep and goats.

The new strategies of the EU for the control and prevention of small ruminants TSE are rooted on the implementation of breeding programs for the selection of genetically-resistant sheep populations. It is well known indeed, that polymorphisms of the prion protein (PrP) gene have great influence on the susceptibility of sheep to TSE; in particular, a specific genotype (136^{AA}154^{RR}171^{RR}) has been proved to be highly resistant to the disease and very few animals carrying this genotype have been reported to be affected to date. The aim of the program is to increase the frequency of the resistant genotype with the final objective of reducing scrapie cases and - eventually - eradicate the disease. Such an approach is ambitious and unprecedented in animal infectious disease control. Nevertheless, it appears the most realistic one. As a matter of fact, the traditional approaches successfully used for the prevention and control of "classical" animal infectious diseases are inefficient or unfeasible in the case of small ruminants TSE.

Although appearing as the most reasonable approach, the selection of resistant genotypes present some

uncertainties. These are related, in particular, 1) to our limited knowledge on the pathogenesis of TSE in semi-resistant or resistant genotypes, 2) to the actual meaning of "resistance" in relation to the possible existence of silent carrier states, 3) to the possible emergence, under the selective pressure of the breeding programs, of TSE strains which have no longer their genetic target in the susceptible genotypes, but in those now considered as resistant.

All the above uncertainties could affect the success of the program but has also great impact for diagnosis and surveillance. This underlines the need of a careful monitoring of the breeding programs which still represent only a component of the health strategies for the control and prevention of animal TSE.

S10.5

HIGH PRESSURE/TEMPERATURE INACTIVATION OF TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES INFECTIVITY

¹Cardone F., ²Brown P., ³Meyer R.,
¹Quanguo Liu Mei Lu, ¹Valanzano A.,
¹Berardi V., ¹Pocchiari M.,

¹Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy,

²National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

³Washington Farms, Tacoma, WA 98443, USA

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) contamination of the human food chain most likely resulted from nervous system tissue in mechanically recovered meat used in the manufacture of processed meats. The widespread occurrence of BSE, coupled with uncertainties about the rigorous implementation of precautionary measures, underline the need for a processing step that would ensure the absence of infectivity in processed meat products.

We have previously shown that the application of several short pulses of high pressure (690-1200 MPa) to hot dog paste 'spiked' with 263K scrapie-infected brain can reduce the level of infectivity by 10^3 to 10^6 mean lethal doses (LD_{50}) per gram of tissue (Brown P. *et al.*, PNAS 100: 6093-6097, 2003). By using the same scrapie strain, we have recently explored a larger range of pressure/temperature/pulse combinations, and a variety of processed meat products (e.g., hamburger, pureed baby food, pâté, meat broth, and pet food) as substrates. We have also studied high pressure inactivation of other strains of transmissible spongiform encephalopathies, (BSE; mouse adapted BSE, mBSE; mouse adapted vCJD, mvCJD).

Brain samples from BSE, mBSE, mvCJD and 263K affected animals were treated at 600MPa/130°C/5' and then assayed by western blotting to measure the

amount of residual PrPres. In order to get an accurate estimate of PrPres concentration, each sample was analysed using a two-fold dilution series. This experimental setting allowed us to demonstrate a reduction in the content of PrPres in all treated samples in comparison with their untreated counterparts: mvCJD and 263K showed the highest reduction (32-fold, about 1.5 log), whereas BSE and mBSE showed only a 4 to 8 fold reduction respectively.

In the second part of this study, 263K-spiked hot-dog aliquots were subjected to a range of different combinations of pressure, temperature and length of treatment. Results from western blot analysis of these samples showed that an exposure as short as 1-minute yields 1 log reduction of PrPres, and that the maximal extent of PrPres clearance (1.5 log) is obtained after 3 minutes, with no increase after further exposure. Keeping the time and temperature constant, progressive destruction of PrPres was observed with pressure increases from 600 to 1000 MPa; keeping time and pressure constant, a similar outcome was obtained when the temperature was increased incrementally from 115 to 134°C.

The results of our study indicate that sensitivity to high pressure treatment is strain-specific, with the maximal effect observed in brain samples from animals infected with the 263K and mvCJD inocula. This is not surprising when considering that TSEs infectious strains can be easily distinguished on the basis of their pathological, biochemical, and physical properties, such as the resistance to inactivation following autoclaving or dry heat processing (Somerville R.A. *et al.*, J. Biol. Chem. 277: 11084-11089, 2002). The small reduction in PrPres concentration in cattle and mouse BSE is in accordance with data obtained by other authors using hydrated autoclaving and confirm that this strain is particularly resistant to inactivation procedures (Taylor D. *et al.*, J. Gen. Virol. 83: 3199-3204, 2002). These results, while awaiting support by ongoing infectivity bioassay studies, suggest that the BSE agent requires a different combination of conditions to achieve satisfactory decontamination. We have previously observed that pressures of 1200 MPa result in loss of 10^6 mean lethal doses per gram of 263K scrapie-infected brain tissue, however, the use of harsh conditions of treatment in an industrial setting may encounter technical constraints and has to be weighed against the possible alteration of the food product. The definition of the process of PrPres clearance as the sum of pressure, temperature and time shows how to deal with this limitation: the same PrPres clearance can be obtained at two different pressures simply adjusting the peak temperature or, to a lesser extent, the time of treatment. These data (always subject to bioassay confirmation) will provide a useful background to develop inactivation protocols specifically designed for each food product yielding the desired combination of quality and safety.

comunicazioni orali

SESSIONE I

Le epidemie nosocomiali

Mercoledì 9 Giugno 2004, 9.00-13.00 Sala D

CO1.1

FEBBRE Q: STORIA DI UN' EPIDEMIA

Panuccio A., Gramegna M.*, Casati R.°, Paganardi L.°, Bellasio A., Biagiola P., Lazzaro E., Marrone A., Pasquali D.

U.O. Immunologia e Virologia

Laboratorio Sanità Pubblica di Milano

** Dipartimento di Prevenzione ASL provincia di Como*

° Medicina V Ospedale. San Paolo di Milano

Nel mese di gennaio 2003 vennero segnalati al Dipartimento di Prevenzione di Como numerosi casi di polmonite ad eziologia sconosciuta in detenuti presso la Casa Circondariale di Como. I detenuti che presentavano spiccata iperpiressia, modesta insufficienza respiratoria ed un quadro radiologico di broncopolmonite a focolai, furono ricoverati presso il reparto medicina V (penitenziaria) dell'Ospedale San Paolo di Milano.

Il nostro Centro è stato coinvolto per la ricerca dell'agente causale, dai medici dell'Osp. San Paolo, che provvedevano ad inviarci i campioni ematici dei 9 detenuti per le indagini sierologiche di seguito elencate: Abs anti-Chlamydia pneumoniae, anti-Legionella pneumophila (1-14) e anti-Coxiella burnetii.

L'inequivocabile risposta immunitaria (positività ad alto titolo in fase 2) contro Coxiella burnetii, agente infettivo della febbre Q è stata riscontrata in 7 dei 9 campioni inizialmente inviati.

La Coxiella burnetii risulta l'agente causale della febbre Q (dall'inglese *Query*), una zoonosi che colpisce l'uomo e che può provocare, specie in ambiente rurale, delle vere e proprie epidemie. La trasmissione del microrganismo può avvenire per ingestione di alimenti contaminati (prodotti carnei o latte non pastorizzato), essendo il serbatoio naturale rappresentato da caprini ovini, bovini, volatili da cortile; i relativi artro-

podi parassiti (zecche) possono giocare un ruolo nella trasmissione all'uomo anche se l'infezione avviene comunemente, negli episodi epidemici, per disseminazione aerogena di polveri infette (microrganismo resistentissimo all'essiccamento).

Essendo la Febbre Q classificata tra le zoonosi, le indagini si sono inizialmente concentrate su una colonia di piccioni terraioli che nidificava nella struttura penitenziaria e su due greggi transumanti (circa 2000 pecore), al pascolo nei prati limitrofi al carcere nel mese di dicembre, che avrebbero potuto rappresentare la sorgente infettiva. Gli accertamenti sierologici sugli ovini, effettuati dall'Ist. Zooprofilattico di Brescia hanno dato esito positivo su una significativa percentuale di casi, rivelando pertanto definitivamente la fonte d'infezione. Il Servizio Veterinario della ASL, ricevuta la segnalazione si è prontamente attivato per le misure di polizia veterinaria, provvedendo al divieto di movimentazione del gregge incriminato, alla bonifica del territorio ed al controllo e successivo trattamento antibiotico mirato degli animali implicati.

Successivamente, oltre ad una buona parte dei detenuti, sono stati controllati sia il personale dipendente della Casa Circondariale, che i soggetti di un'area più vasta, ma circoscritta (zona di transito del gregge), venuti all'osservazione dei Medici di Medicina Generale della zona per episodi febbrili e/o broncopneumonitici nei precedenti mesi.

Le ulteriori ricerche hanno confermato l'esistenza di un vasto episodio epidemico legato al transito del gregge coinvolgente anche un'ampia area limitrofa al carcere.

L'indagine sieroepidemiologica è stata condotta utilizzando metodica IFA, su vetrini contenenti la Coxiella b. in fase 2 (fase acuta della malattia) e fase 1 (fase di convalescenza). Sono stati esaminati 340 campioni di cui 270 provenienti dal carcere (62 detenuti, 208 dipendenti) e 70 soggetti esterni al carcere che avevano manifestato sintomi riconducibili all'infezione.

Dal totale dei casi pervenuti alla nostra osservazione, 81 campioni (24%) sono risultati positivi sia alla fase

2 che alla fase 1 della Coxiella b.; 75 campioni (22%) sono risultati positivi solo alla fase 2; 5 campioni (1%) positivi soltanto alla fase 1; 179 campioni (53%) risultavano negativi ad entrambe le fasi. A distanza di 6 mesi sono stati effettuati dei ricontrolli sierologici sul personale operante presso la Casa Circondariale e si è constatato un cospicuo numero di passaggi, dallo stadio di fase acuta (fase 2) a quella di convalescenza (fase 1). Già dal mese di aprile, l'epidemia è stata ritenuta debellata, per il pronto ed adeguato intervento delle strutture preposte a fronteggiare l'episodio.

comunicazioni orali

SESSIONE 2

Patogeni emergenti (in virologia)

Mercoledì 9 giugno 2004, 9.00 - 13.00 Sala F

CO2.1

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI NOROVIRUS IDENTIFICATI A PARMA NEL CORSO DEL 2002

Medici M.C., Martinelli M., Abelli L.A., Ruggeri F.M.*, Di Bartolo I.*, Valcavi P., Casula F., Arcangeletti M.C., Pinardi F., De Conto F., Calderaro A., Dettori G., Chezzi C.

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

*Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

In studi precedenti abbiamo dimostrato che anche in Italia i norovirus (famiglia *Caliciviridae*) circolano con frequenza relativamente alta in pazienti pediatrici ricoverati con gastroenterite (22,3% Gennaio-Aprile 2000 e 14,7% Gennaio-Dicembre 2002 in soggetti selezionati e non per l'assenza di altri agenti virali nelle feci, rispettivamente). Questi virus, caratterizzati da un genoma ad RNA monocatenario a polarità positiva, presentano un'elevata variabilità genetica tale da distinguerli in diversi genotipi filogeneticamente compresi in almeno due genogruppi principali, GI e GII. In questo studio è stata condotta la caratterizzazione molecolare di 70 ceppi di norovirus rivelati mediante RT-PCR "nested", da noi messa a punto, nell'ambito di un programma di sorveglianza di un anno condotto su campioni di feci appartenenti a 623 pazienti con sospetta infezione da virus ad eliminazione fecale. L'analisi molecolare e filogenetica dei ceppi è stata condotta attraverso il confronto delle sequenze genomiche con quelle depositate in GenBank e in banca dati specifica. Dei 70 ceppi di norovirus, identificati nell'11,2% dei

pazienti esaminati, 69 (98,6%) sono risultati di GII e uno (1,4%) di GI, genotipo Winchester. I ceppi di norovirus di GII erano riconducibili a 5 genotipi diversi. La maggior parte dei ceppi caratterizzati hanno circolato con una certa frequenza in diverse parti del mondo; al contrario altri sono stati segnalati solo in pochi paesi. L'analisi molecolare dei ceppi, in associazione ai dati anamnestici e clinici dei pazienti con infezione, ha consentito di individuare almeno 5 episodi epidemici di gastroenterite.

Gli autori concludono che nell'area di Parma i casi di infezione da norovirus sono riconducibili prevalentemente ad episodi sporadici causati fondamentalmente da un unico genotipo. I risultati della caratterizzazione molecolare verranno discussi anche in relazione alla distribuzione temporale e alle correlazioni filogenetiche.

CO2.2

TICK-BORNE ENCEPHALITIS (TBE): PRIMO CASO IN FRIULI VENEZIA GIULIA (FVG)

Ruscio M.¹, Beltrame A.², Cruciatti B.³, Scudeller L.², Rorato G.², Gigli GL.³, Viale PL.²

¹ Laboratorio Ricerche Cliniche e Microbiologia, Ospedale S. Daniele del Friuli,

Via Trento e Trieste n°33, 33038 S. Daniele del Friuli

² Clinica di Malattie Infettive Policlinico Universitario a Gestione Diretta, Università degli Studi di Udine, Via Colugna n° 50, 33100 Udine

³ Struttura Operativa Complessa Neurologia Neurofisiopatologia, Azienda Ospedaliera Santa Maria della Misericordia, Pl. Santa Maria della Misericordia n°15 - 33100 Udine

La TBE è una zoonosi diffusamente presente in Europa, descritta raramente in alcune regioni italiane.

Il 28/07/03 un donna di 36 anni è giunta all'Ospedale di Gemona del Friuli lamentando da circa 24 ore cefalea, vomito e dolore alle spalle. Circa 2 settimane prima la paziente aveva presentato per 3 giorni una sindrome simil-influenzale. La paziente riferiva un morso di zecca durante un week-end trascorso in montagna in Provincia di Udine (Moggio-Chiusaforte). All'atto del ricovero si rilevava: 39°C, rigidità nucale, paralisi degli arti superiori (prevalentemente braccio sx e spalle), ipostenia dell'arto inferiore sx. Gli esami eseguiti evidenziavano: GB 13.840 x 10⁹/L (PMN 83%), TC encefalo negativa, liquor: limpido, GB 343/mm³ (300 PMN), glicorrachia 48 mg/dL, protidorrachia 900 mg/dL. Veniva instaurata una terapia antibiotica empirica. Trasferita presso la Neurologia dell'Ospedale di Udine, veniva effettuata la RMN del rachide cervicale che dimostrava una lesione infiammatoria del midollo, con esclusivo interessamento delle corna anteriori. Poiché le sierologie per agenti neurotropi eseguite su siero e liquor risultavano negative, veniva eseguita la ricerca per TBEV: liquor IgM 4.7 index (positivo > 1 index) e IgG 48 U/ml (positivo > 5 U/ml), siero IgM 6.8 index e IgG 49 U/ml. Analoga positività si è avuta con i test HIT e NT (ISS), confermando la diagnosi di meningo-encefalo-mielite da TBEV.

Il FVG è da molti anni considerata regione endemica per Borreliosi di Lyme e confina con paesi ad elevata endemia per TBE. Poiché la presentazione clinica della TBE non è caratteristica, la diagnosi si avvale dell'anamnesi e della sierologia. La segnalazione di questo caso richiama la necessità di 1) inserire la sierologia per TBE nei soggetti, residenti o che abbiano soggiornato in questi territori, con manifestazioni neurologiche febbrili, 2) potenziare i sistemi di sorveglianza, promuovendo studi sieroepidemiologici e prospettici che permettano di quantificarne la reale incidenza.

CO2.3

STUDIO DELLA PREVALENZA DELLE INFEZIONI DA ENTEROVIRUS ED ALTRI VIRUS ENTEROTROPI IN PAZIENTI CON O SENZA INFEZIONE DA HIV

Minosse C., Zaniratti M.S., Calcaterra S., Carletti F., Pisciotta M., Pillitteri L., Corpolongo A., Narciso P., Anzidei G., Capobianchi M.R.

*Istituto Nazionale delle Malattie Infettive
"Lazzaro Spallanzani", Via Portuense 292, 00149 Roma.*

Per studiare la prevalenza di infezioni da virus enterici, con particolare riferimento a soggetti HIV-positivi, abbiamo applicato un pannello molecolare virologico

completo ad una popolazione campione afferente all'INMI nel periodo Maggio 2002 – Maggio 2003. Sono stati raccolti campioni di feci o tampone rettale da 102 pazienti; in parallelo, sono stati raccolti i principali dati clinico-epidemiologici.

I campioni provenivano da 62 pazienti adulti HIV-positivi (12 con sintomatologia gastrointestinale, 50 senza sintomatologia). 40 provenivano da soggetti HIV-negativi, con (25) o senza (15) sintomatologia. Di questi, 31 erano bambini, di cui 20 erano sintomatici. Nei campioni è stata effettuata la ricerca degli acidi nucleici virali con PCR o RT-PCR; in parallelo, è stato eseguito l'isolamento virale. L'identificazione del virus è stata effettuata mediante RFLP o sequenziamento nucleotidico. Gli isolati di enterovirus sono stati caratterizzati anche mediante neutralizzazione.

Alla ricerca degli acidi nucleici sono risultati positivi 18 campioni (17.6%), di cui 9 con Adenovirus (8.8%); 4 con Norovirus (3.9%), 3 con Enterovirus (2.9%); 2 (con Rotavirus 1.9%); e 1 con HAV (0.9%); nessun caso è risultato positivo per HEV o Astrovirus. In 2 casi è stata riscontrata la presenza contemporanea di Enterovirus+Adenovirus e Norovirus+Rotavirus. In entrambi i casi i pazienti erano bambini HIV-negativi, con forte diarrea, di cui uno era anche positivo alla Shigella. L'isolamento virale è risultato positivo in 4 campioni, di cui 2 infetti con Adenovirus e 2 con Enterovirus.

I risultati indicano una notevole circolazione di virus a tropismo gastroenterico nella popolazione esaminata, anche in assenza di sintomatologia. In particolare, tra i sintomatici prevalevano i bambini HIV-negativi, mentre tra gli asintomatici erano prevalenti adulti HIV-positivi. Quest'ultimo dato conferma la elevata prevalenza di virus enterotropi in soggetti immunodepressi, e suggerisce l'opportunità di analizzare la correlazione tra grado di immunodepressione, eventuali terapie antiretrovirali e rilascio asintomatico di virus attraverso le feci.

CO2.4

PREVALENCE OF S-GENE MUTANTS OF HEPATITIS B VIRUS IN ITALIAN BLOOD DONORS AND PATIENTS WITH CHRONIC HBV INFECTION

Tagger A.¹, Ribero M.L.¹, Menatti E.¹, Donato F.², Gelatti U.², Covolo L.², Mora R.³, Azzario F.⁴

¹Istituto di Virologia, Univ. Milano;

²Cattedra di Igien, Univ. Brescia;

³Ortho Clinical Diagnostics, Milano;

⁴Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Azienda Ospedaliera Niguarda Ca' Granda, Milano, Italy.

Background

Diagnostic HBsAg assays use antibodies recognizing the a-determinant of the HBV S domain and in rare

cases HBsAg can be falsely negative, depending on the type of mutant and the diagnostic kit used. We investigated the prevalence of naturally occurring mutants in a cohort of blood donors and patients with chronic HBV infection.

Methods

We analyzed the amino acid sequences of S domain of 100 first-time blood donors who were HBsAg positive as well as 52 patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and subjects unaffected by liver diseases or tumours as controls. All samples from each group were HBsAg positive by AxSYM (Abbott) and by Vitros ECI (Ortho). Mutations in the a-determinant were defined as changes in S-protein sequence (positions 120-147) compared to the wild-type (Wt) consensus sequence of the corresponding HBV genotype.

Results

Among donors, 85 were infected by HBV genotype D and 15 by genotype A. All HCC patients and controls were infected by genotype D. Wt virus was prevalent in donors (about 78%) infected by genotype D and decreased to 58% in HCC patients and controls. One G145R mutant was detected among HBsAg positive controls coexisting, however, with Wt virus.

Conclusions

The most frequently described mutants (P142S, D144A, G145R alone or in combination) impairing HBsAg recognition with commercial diagnostic kits were not detected in blood donors in this study. Such mutants were rarely seen in patients with end-stage liver disease, occurring in many cases in a mixed population with Wt virus.

comunicazioni orali

SESSIONE 4

Le resistenze antibatteriche e antivirali

Giovedì 10 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala D

CO4.1

ANALISI MOLECOLARE DI ENTEROCOCCI GLICOPEPTIDO-RESISTENTI D'ISOLAMENTO OSPEDALIERO NEL VENETO (2003)

Boldrin C., Ramon M C. °, Tommasini T.*, Grossato A.

°Dip. di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche [Università Padova], Lab. Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche dell'Ospedale di Agordo[BL],

*Lab. di Microbiologia-Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

Questo studio è volto a valutare la diffusione della glicopeptido-resistenza tra gli enterococchi (GRE). Sono stati confrontati gli isolamenti effettuati nel 2003 presso il Servizio di Microbiologia-Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova e quelli dell'Ospedale di Agordo. In quest'ultimo ceppi GRE sono stati isolati per la prima volta. I GRE di Padova (13) provenivano prevalentemente da pazienti trapiantati (liquidi di drenaggio), mentre quelli dell'Ospedale di Agordo (7: urine da catetere, feci) erano stati isolati da anziani, ricoverati in reparti di lungo-degenza. L'identificazione di specie è stata effettuata mediante API 20strep e l'antibiotico-sensibilità saggiata sia con metodi tradizionali (Kirby-Bauer) che con microdiluzioni in terreno liquido. Il tipo di operone *van* è stato esaminato mediante PCR e la caratterizzazione molecolare eseguita con PFGE. I ceppi studiati sono risultati appartenere a 4 specie diverse: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus* con netta prevalenza di *E. faecium* (80 %). Tutti presentavano fenotipo e genotipo *van A* e avevano lo stesso profilo di antibiotico-resistenza (sensibili solo a linezolid, qui-

nupristina/dalfopristina, cloramfenicolo, tetracicline). La caratterizzazione molecolare ha dimostrato che tra i ceppi di Agordo si potevano individuare tre diversi pulsotipi, di cui uno comune a quattro ceppi, isolati da pazienti diversi ma ricoverati nello stesso reparto in un breve arco di tempo. I dati anamnestici hanno rivelato che tutti i pazienti erano stati sottoposti a terapie antibiotiche (incluse vancomicina o teicoplanina). Tra gli isolati di derivazione padovana solo due ceppi presentavano profilo simile tanto da suggerire una possibile origine comune. Essi provenivano da due diversi pazienti, ospiti dello stesso reparto ma a non contemporaneamente. Poiché i pazienti da noi osservati (trapiantati, lungo-degenti) vengono considerati da autorevoli studiosi come una potenziale riserva di GRE a livello ospedaliero, la caratterizzazione molecolare è il primo passo nella prevenzione della diffusione di microrganismi di difficile eradicazione.

CO4.2

MONITORAGGIO DEI MUTANTI RESISTENTI ALLA LAMIVUDINA NEI PAZIENTI HBV CRONICI

Rondinelli V.¹, De Grazia R.¹, Saraceno R.¹, Lepore M.G.¹, Masciari R.¹, Scerbo P.², Scerbo A.², Cosco L.², Bulla F.², Ferraro T.², Filia C.³, Vasapollo I.³

¹Virologia e Microbiologia Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio -Catanzaro

²Malattie Infettive Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio-Catanzaro

³Microbiologia e Virologia Ospedale Jazjolino ASL N° 8 - Vibo Valentia

Introduzione: La terapia dell'epatite cronica da virus B (HBV) prevede, da alcuni anni, l'utilizzo della lamivudina, un analogo nucleosidico. Il prolungamento di

tale trattamento antivirale espone il paziente alla selezione di virus mutanti (comunemente noti con la sigla YMDD) capaci di determinare resistenza al farmaco e quindi un fallimento terapeutico con ricomparsa, nei casi in cui si fosse verificata un'efficace soppressione della replicazione virale, di livelli titolabili di HBV-DNA e di elevazione delle transaminasi. La percentuale di comparsa delle mutazioni è di circa il 15% durante il I° anno, di circa il 45 e il 65% rispettivamente nel II° e III° anno di terapia. I test di farmacoresistenza rappresentano dunque una necessità sia per ottimizzare il monitoraggio delle varianti mutazionali in corso di terapia sia per valutare l'opportunità di nuove e possibili opzioni terapeutiche quali l'Adefovir e l'Entecavir.

Scopo: Il nostro studio monitorizza la comparsa, nei pazienti con epatite cronica da HBV in trattamento con lamivudina, di mutanti resistenti e ne rileva l'incidenza; valuta la percentuale di successo terapeutico e l'impatto clinico del test di farmacoresistenza.

Materiali e Metodi: Nel 2002 abbiamo arruolato 30 pazienti (22 di sesso maschile ed 8 di sesso femminile, età media 38 anni) con epatite cronica da HBV eleggibili al trattamento con lamivudina alla dose di 100 mg/die per os per 18 mesi. Tale coorte comprendeva 14

soggetti già trattati con Interferone (IFN) e non responder e 16 naive ad antiretrovirali. Prima dell'inizio della terapia abbiamo eseguito il test di farmacoresistenza per escludere eventuali mutanti preesistenti. Il protocollo di studio prevedeva il controllo mensile dell'ALT, il controllo trimestrale dell'HBV-DNA e quello semestrale della farmacoresistenza. Per il dosaggio della viremia abbiamo utilizzato il kit HBV Monitor della ditta Roche. Per la rilevazione dei mutanti resistenti abbiamo utilizzato il kit INNO-LiPA HBV DR della ditta Innogenetics che prevede l'amplificazione nested dei domini B e C del gene della DNA polimerasi seguita da una reazione di ibridizzazione inversa del DNA su striscia sulla quale sono presenti 19 probes che consentono l'identificazione sia dei ceppi wild-type sia di quelli che presentano mutazioni ai codoni 528, 552 e 555. Per genotipizzare il virus abbiamo utilizzato anche il sequenziamento (TRUGENE HBV Genotyping della ditta Bayer) e la comparazione delle sequenze ottenute con quelle di consenso (genotipi A-G, software Open-Gene Systems) ha consentito di rilevare mutazioni sia nella regione dell'Antigene di superficie (SAg) che in quella della polimerasi (RT/Pol).

Grafico 1

NEGATIVIZZAZIONE HBV-DNA

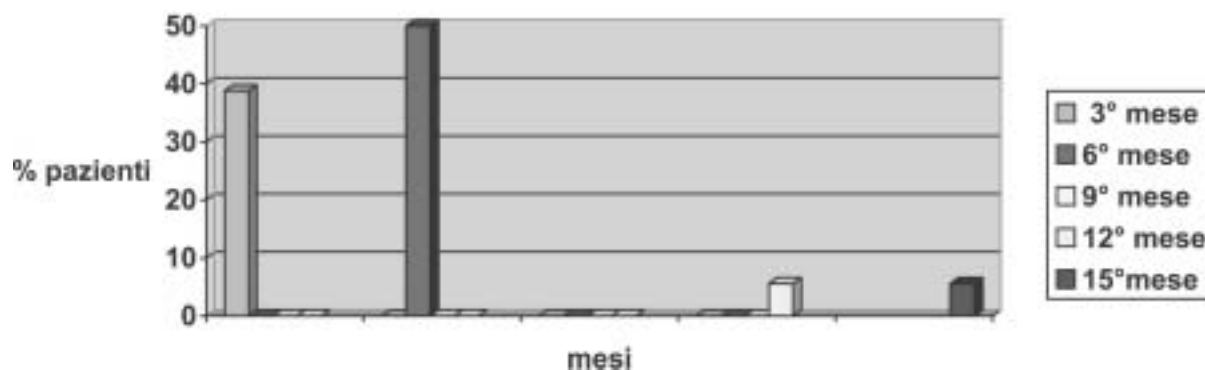
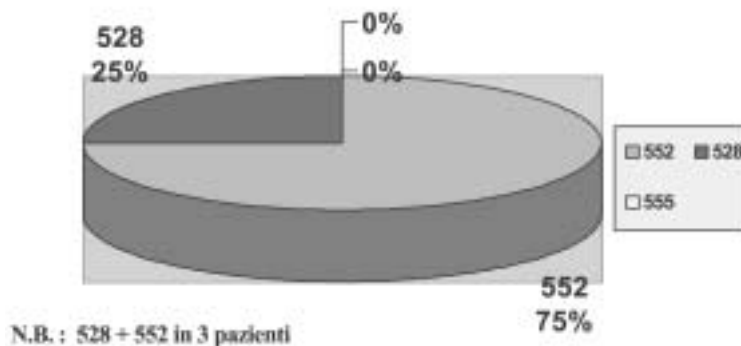


Grafico 2

% codoni di resistenza



Risultati: Al termine dello studio, in 18 (60%) dei 30 pazienti arruolati l'HBV-DNA non è stato rilevabile: 7 (38,8%) non sono stati viremici già al 3° mese, 9 (50%) al 6° mese, 1 (5,6%) al 12° ed infine 1 (5,6%) al 15° mese (vedi grafico 1) con normalizzazione dell'ALT che ha sempre preceduto la negativizzazione dell'HBV-DNA. Non sono state riscontrate negativizzazioni al 9° mese. In 7 pazienti, in seguito, abbiamo apprezzato una ripresa della viremia per insorgenza di farmacoresistenza. In 12 pazienti, invece, l'HBV-DNA è risultato persistentemente titolabile.

Complessivamente sono stati rilevati, con significativa ricomparsa della viremia, 12 casi di mutanti resistenti alla lamivudina di cui 5 (41,7%) appartenenti ai 12 pazienti non-responder e 7 (58,3%) ai 18 inizialmente considerati tutti responder. La mutazione sul codone 552 è stata riscontrata in 9 pazienti (75%) mentre quella sul codone 528 in 3 (25%). Nessuna mutazione ha coinvolto il codone 555. Interessante il dato che in tre pazienti sono state rilevate bande di mutazione sia nel codone 528 che nel 552 (vedi grafico 2). In un paziente relapser il test di ibridizzazione su striscia ha messo in evidenza la presenza di ceppi mutanti prima del test di genotipizzazione tramite sequenziamento.

Discussione e conclusioni: L'analisi dei risultati ci consente alcune considerazioni:

- la negativizzazione della viremia nei pazienti in trattamento con lamivudina si verifica soprattutto nel secondo trimestre dall'inizio della terapia;
- il fallimento terapeutico riguarda, tra non-responder e relapser, 19 pazienti (circa il 64%);
- il fallimento terapeutico non è necessariamente imputabile all'insorgenza di mutazioni: 7 pazienti su 12 intrinsecamente non rispondono al trattamento con lamivudina;
- il successo terapeutico, al termine dei 18 mesi di protocollo, riguarda 11 pazienti (circa 36%);
- il test di ibridizzazione è in grado di rilevare precocemente la presenza di mutanti forse anticipandone la rilevazione tramite sequenziamento;
- il test di farmacoresistenza è uno strumento importante per il clinico in quanto consente anche una corretta valutazione delle opzioni terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Aberle SW, Kletzmayr J, Watschinger B, et al. Comparison of sequence analysis and the INNO-LiPA HBV DR line probe assay for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus strains in patients under various clinical conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001: May, 1972-74
2. Pas SD, De Man R, Fries E, et al. Can we efficiently detect YMDD variants of hepatitis B virus during lamivudine therapy? 5th Annual Meeting of the ESCV, 2001, September, Finland.
3. Niesters GM, Pas SD, Wolters L, et al. The use of accurate measurement of HBV DNA in combination with the INNO LiPA HBV resistance during lamivudine treatment: implications for disease management. 51st American Association for the Study of Liver Diseases 2000, October: Vol. 32, n° 4.
4. Sablon E., Yuen M.F, Decraemer H, et al. Early and sensitive detection of drug resistance-associated mutations in Hepatitis B infected patient during lamivudine therapy: the INNO-LiPA HBV DR assay proves to be superior to direct sequencing. 52nd American Association for the Study of Liver Diseases 2001, November: Vol. 34, n° 4.

comunicazioni orali

SESSIONE 5

Trapianti: il contributo del laboratorio di Microbiologia

Giovedì 10 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala F

CO5.1

CONFRONTO TRA VALORI SOGLIA DI DNAEMIA E PP65-ANTIGENEMIA NELLA TERAPIA PRESINTOMATICA DELLE INFEZIONI DA CITOMEGALOVIRUS UMANO (HCMV) NEI PAZIENTI RICEVENTI TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE. ANALISI PRELIMINARE.

Gerna G.¹, Locatelli F.², Alessandrino E.P.³, Lilleri D.¹, Furione M.¹, Gatti M.¹, Zavattoni M.¹, Torsellini M.¹, Baldanti F.1

¹Servizio di Virologia,

²Oncoematologia Pediatrica,

³Divisione di Ematologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy.

Obiettivo.

È in corso uno studio prospettico volto a confrontare i valori soglia di viral load definiti mediante i test di pp65-antigenemia e DNAemia nella terapia presintomatica dell'infezione da citomegalovirus umano (HCMV) nei pazienti riceventi un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCTR).

Metodologia.

Dall'inizio del 2003 è stato avviato l'arruolamento di 200 pazienti (adulti e pediatrici) randomizzati in due bracci mediante pp65-antigenemia (braccio di controllo) o DNAemia.

Il monitoraggio è bisettimanale nei primi 90 giorni e mensile tra 90 e 360 giorni dal trapianto.

Il trattamento viene iniziato alla prima positività confermata nel braccio pp65-antigenemia e in corrispondenza di un valore ≥ 100 copie di DNA/10 μ l sangue nel braccio DNAemia. Il trattamento viene interrotto dopo

due risultati negativi consecutivi. L'obiettivo primario è confrontare il numero dei pazienti trattati.

Risultati.

Ad oggi, nel braccio pp65-antigenemia 21/32 (65.6%) pazienti hanno sviluppato un'infezione da HCMV e 14 (43.7%) sono stati trattati; nel braccio DNAemia 16/30 (53.3%) HSCTR sono risultati positivi per HCMV e 9 (30.0%) sono stati trattati. In particolare, di 12/22 (54.5%) pazienti pediatrici risultati positivi per HCMV nel braccio pp65-antigenemia, 6 (27.3%) sono stati trattati, mentre di 9/21 (42.9%) positivi nel braccio DNAemia 3 (14.3%) sono stati trattati. Inoltre, di 9/10 (90%) pazienti adulti positivi nel braccio pp65-antigenemia 8 (80%) sono stati trattati, mentre di 7/9 (77.8%) positivi nel braccio DNAemia 6 (66.7%) sono stati trattati. Nessun paziente ha sviluppato una malattia sintomatica da HCMV.

Conclusioni.

- i) La DNAemia può sostituire la pp65-antigenemia nel monitoraggio dell'infezione da HCMV;
- ii) nei pazienti trapiantati adulti la frequenza di infezione e di trattamento è nettamente più elevata che nei pediatrici;
- iii) nei pazienti pediatrici, l'introduzione di un valore soglia di DNAemia per l'inizio della terapia anti-HCMV può evitare il trattamento di un numero superiore di pazienti rispetto al braccio pp65-antigenemia.

CO5.2

ASPETTI VIROLOGICI ED IMMUNOLOGICI IN PAZIENTI HIV+ E HIV- SOTTOPOSTI A TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI.

Costanzo C., Bortolin M.T., Pratesi C., Bidoli E. *, Zanussi S., Caffau C., D'Andrea M., Aversa P., Varaschin P., Crepaldi C., Simonelli C°, Tedeschi R., De Paoli P.

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

Introduzione e Scopo.

Nei pazienti HIV+ con tumore, accanto alla chemioterapia tradizionale è stata recentemente utilizzata la chemioterapia ad alte dosi (HCT) con trapianto autologo di cellule staminali (ASCT). Scopo dello studio era la valutazione della cinetica di replicazione di HIV, EBV o di altre coinfezioni virali (HCV) e del recupero immunologico nei pazienti con linfoma refrattario o in ricaduta sottoposti a HCT e ASCT. I pazienti HIV+, venivano confrontati con gli HIV-, considerando che nei primi esiste un deficit immunologico indotto dal virus stesso.

Materiali e Metodi.

Pazienti (pz): 17 HIV+ sotto terapia HAART (4 HD, 13 NHL) e 38 HIV- (20 NHL alto grado, 11 NHL basso grado e 7 HD). Parametri virologici: viremia HIV e HCV (b-DNA, Chiron); viremia EBV (TaqMan real time PCR, Pratesi et al. J Clin Virol 2003). Parametri immunologici: CD4, CD8, CD19, CD4CD45RA, CD56, CD4CD45RO (citofluorimetria). Follow-up: basale (prima dell'inizio CT debulking); al momento della raccolta cellule staminali (ASCT); prima dell'inizio della HCT; dopo il periodo di aplasia (due settimane dal ASCT); mensilmente fino a 3 mesi da ASCT e ogni tre mesi.

Risultati.

In tutti i pz la viremia HIV era stabile (<50cp/ml) durante il follow-up con una sola eccezione (103cp/ml) in un pz a distanza di un mese dal ASCT. Tutti i pz erano EBV sieropositivi con DNA virale rilevabile in un pz al basale (29125cp/ml) e in un altro dopo la rein-fusione (19600cp/ml) con incremento della viremia nel tempo. Due pz erano HIV-HCV+ e uno HIV+HCV+ con livelli di RNA stabili nel tempo (media: >7692308, 160525, 498788 UI/ml, rispettivamente). La mediana dei CD4 pretrattamento era 198 cell/ul ed il nadir (98 cell/ul) è stato raggiunto due settimane dopo ASCT. Tali valori rimanevano bassi a tre mesi (mediana 103 cell/ul) con una ripresa a sei mesi; situazione analoga nei pz HIV-.

Considerazioni Conclusive.

La replicazione di HIV resta sotto controllo dell'

HAART anche quando l'immunosoppressione è massima (aplasia). Non c'è, nel breve, replicazione di EBV e anche la viremia HCV non subisce variazioni correlabili alla grave linfopenia. Il recupero dei CD4 richiede circa tre mesi; pur partendo da livelli più bassi negli HIV+, la dinamica del recupero non differisce tra HIV+ e HIV-.

CO5.3

VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DI INFEZIONE DA TOXOPLASMA GONDII IN UNA POPOLAZIONE DI TRAPIANTATI D'ORGANO SOLIDO NEGATIVI NEL PRE-TRAPIANTO.

Meroni V., Zerrilli E., Genco F., Nocita B., Poletti F., Minoli L.

Dipartimento di Malattie Infettive Università degli Studi, IRCCS Policlinico San Matteo Viale Taramelli 5 27100 Pavia

Scopo di questo studio è valutare l'esistenza di una differenza statisticamente significativa nella frequenza di sieroconversione per Toxoplasmosi in riceventi recettivi con donatori immuni (R/D⁺) o non immuni (R/D⁻), l'utilità della profilassi igienico-alimentare consigliata a questi pazienti e l'efficacia del trattamento chemioprolattico preventivo. Tutti i pazienti sono stati valutati con diverse tecniche sierologiche nel pre-trapianto comunque del periodo di e a tempi diversi dopo il trapianto d'organo solido a conclusione comunque del periodo di eventuale chemioprolassi con pirimetamina + sulfametopirazina impiegato per 2 mesi nei soli mismatch (R⁺/D⁻). Sono stati impiegati i tests per IgG e IgM in uso presso il laboratorio (ELISA IgG IgM Diasorin, ELFA IgG Biomerieux); nei casi di sospetta sieroconversione sono stati effettuati anche i tests IgM ISAGA, IgG Avidità (Biomerieux) e ELISA IgA (Diasorin). Dati preliminari portano a considerare che non ci sia differenza tra la percentuale di sieroconversione in R/D⁻ e R/D⁺. Lo studio in questione ha inoltre permesso di meglio definire il protocollo di sorveglianza della infezione/malattia da *Toxoplasma gondii* raccomandando un controllo sierologico al momento del trapianto e semestrale nel post-trapianto. In rari casi infatti anche i riceventi immuni nel pre-trapianto a causa della terapia immunosoppressiva possono riattivare questa infezione con gravi manifestazioni cliniche documentate anche da un importante incremento dei sierotitoli e positività della PCR sul sangue periferico. Alla luce di ciò anche i riceventi immuni nel pre-trapianto vanno considerati a rischio e sorvegliati soprattutto in presenza di quadri clinici che comportino un sospetto di malattia toxoplasmica attiva (febbre, localizzazioni d'organo muscolari, cardiache, retiniche, epatiche)

CO5.4

QUANTIZZAZIONE DI DNA DI POLIOMAVIRUS BK NEL SANGUE DI PAZIENTI TRAPIANTATI DI RENE CON NEFROPATIA BK-CORRELATA

¹Furione M., ¹Baldanti F., ¹Gatti M., ²Tarantino A., ²Fogazzi G.B., ¹Rovida F., ¹Gerna G.

¹IRCCS Policlinico San Matteo,
Servizio di Virologia, Pavia;
²IRCCS Ospedale Maggiore,
Divisione di Nefrologia, Milano.

Scopo:

L'obiettivo dello studio è stata la messa a punto di un test molecolare per la diagnosi di nefropatia BK-correlata in pazienti trapiantati di rene. A tal fine, è stato sviluppato un saggio per la quantizzazione del DNA di poliomavirus BK su sangue periferico e urine.

Metodo:

Tale metodica è basata sull'utilizzo di un controllo interno di reazione (plasmide composto da una sequenza eterologa di DNA fiancheggiata dalla sequenza target riconosciuta da primers omologhi a una sequenza conservata del gene di poliomavirus "large T-antigen") e di standard esterni di quantificazione (differenti quantità di plasmide che veicola il frammento del gene "large T-antigen" amplificato mediante PCR).

Nell'ambito dei poliomavirus umani le sequenze di BK virus e di JCV sono state differenziate mediante sequenziamento. Sul sedimento urinario, inoltre, è stata eseguita la quantizzazione delle "decoy cells".

Risultati:

Sono stati analizzati mediante PCR i campioni di sangue e urine raccolti dal gennaio 2000 al dicembre 2002 su una coorte di 201 trapiantati di rene.

Di questi, 106 presentavano una funzionalità renale alterata, e 95 una funzionalità normale. Quattordici pazienti (6.9%) sono risultati PCR-positivi nel sangue (livelli mediani: 500 copie/ml, range <1000-50,000). Tutti i pazienti positivi per DNA nel sangue avevano alterazione della funzionalità renale.

Di questi 4/7 (57.1%) risultavano positivi per la ricerca di antigeni di poliomavirus all'immunostochimica.

Gli stessi mostravano un alto livello di decoy cells" sul sedimento urinario (>5/50 cellule per campo 400x). La ricerca di DNA nelle urine risultava positiva in 116/189 pazienti (61.4%).

Conclusioni:

La quantizzazione di DNA di poliomavirus è una metodica sensibile e specifica per la diagnosi di nefropatia BK-correlata. Viceversa, la presenza di DNA virale nelle urine ha scarso significato clinico.

CO5.5

REAL-TIME PCR PER IL VIRAL LOAD DI CITOMEGALOVIRUS NEL TRAPIANTO D'ORGANO: CONFRONTO CON ANTIGENEMIA E PCR END-POINT.

Zaccaria T.; Enrietto M; Pittaluga F; Ghisetti V; Marchiaro G.

S.C. Microbiologia
Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino,
c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

Nel trapianto d'organo, il monitoraggio dell'infezione da CMV mediante la ricerca dell'antigene pp65 è sofferto di importanti variabili: manualità, tempi lunghi di esecuzione, esperienza nella lettura e interpretazione dei risultati. I sistemi per la misurazione del viral load di CMV mediante PCR end-point, parzialmente automatizzati, consentono risultati oggettivi più precocemente dell'antigenemia, richiedono tempi lunghi e hanno un range dinamico ristretto.

Lo scopo del lavoro è stato confrontare la quantizzazione del viral load di CMV mediante real-time PCR (RT-PCR, AmpliMedical, Buttigliera, To) con l'antigenemia e la quantizzazione mediante PCR end-point (COBAS Amplicor Monitor, Roche), nei leucociti (n=144) di 30 pazienti trapiantati con infezione da CMV (18 sintomatici e trattati e 12 asintomatici, non trattati).

Per valutare la sensibilità e specificità della RT-PCR sono stati saggiati rispettivamente 59 campioni positivi mediante antigenemia e/o COBAS e 58 campioni negativi in nested PCR per CMV DNA e COBAS. C'è stata una buona correlazione tra RT-PCR e COBAS ($r=0.774$) e con antigenemia (RT-PCR $r=0.693$, COBAS $r=0.729$). La sensibilità di RT-PCR rispetto a COBAS è stata del 94.5%, la specificità dei due sistemi rispetto alla nested PCR di 98.3% e 91.5%. I valori di viral load hanno mostrato andamento simile, con risultati più alti nei pazienti sintomatici (mediana RT-PCR: $3.5 \log_{10}/500.000$ cellule, COBAS 3.9 logs) che in quelli asintomatici (2.0 logs in RT-PCR contro 3.1 logs con COBAS). Per valori di antigenemia corrispondenti a 0, da 1 a 10, da 11 a 100 e da 101 a 1000/200.000 leucociti sono risultati i seguenti valori mediani di DNA mediante RT-PCR: 20 copie/500.000 (COBAS: 615), 60 (COBAS: 857), 640 (COBAS: 5900) e 4300 (COBAS: 9750).

In conclusione, la RT-PCR è metodo molto sensibile e specifico, con un turnaround time più basso rispetto alla PCR end-point (3 ore contro 7) e più agevole per diagnosi tempestive.

comunicazioni orali

SESSIONE 6

Le linfadenopatie infettive

Giovedì 10 giugno 2004, 9.00-13.00 Sala Carraresi

CO6.1

CASO CLINICO DI LINFOADENITE TUBERCOLARE

**Mariano V.M.*, Marchetti D.°, Squintani L.°,
Falcone F.*, Gaspari G.°**

*U.O. di Pneumotisiatria Ospedale Bellaria, Azienda USL di Bologna, Bologna

°U.O. Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia Ospedale Bellaria, Azienda USL di Bologna

Paziente di 27 anni, rumena, in Italia da 1 anno, ex-prostituta, fumatrice. Una figlia di 10 anni in Romania ed un parto prematuro ad ottobre 2003.

A Novembre 2003 comparsa di piccola tumefazione in regione latero-cervicale dx.

Il 1° Febbraio 2004 modesta emoftoe, aumento improvviso di volume della tumefazione latero-cervicale dx e comparsa di tumefazione in latero-cervicale sn.

Il 7 Febbraio 2004 si reca al Pronto Soccorso per improvviso dolore lombo-sacrale sin. (riferito dalla paziente come conseguenza di maltrattamenti subiti qualche mese prima).

Ricovero ospedaliero.

Indagini eseguite:

- Rx torace: interstiziopatia con aspetti di tipo micro-nodulare diffusi a livello dei lobi superiori ed infiltrato in regione apico-interclevale dx.
- TC addome: nello spessore del muscolo psoas di sn. si apprezza raccolta di tipo ascessuale di 3,2 cm di diametro.
- Ecografia del collo: in sede latero-cervicale dx. si apprezzano raccolte fluide, parzialmente organizzate di diametro tra 3-4 cm. e, multiple linfadenomegalie da 1,5 a 2,5 cm di diametro. Anche in sede latero-cervicale controlaterale si apprezzano multiple linfadenomegalie di cui la maggiore misura 3,5 cm. e presenta ecostruttura fortemente disomogenea.

- Mantoux 5 U di PPD: negativa.
- Esame microscopico per BAAR su espettorato: negativo.
- Emocoltura: positiva per staphylococco epidermidis.
- Aspirato pus dalla raccolta laterocervicale dx.: esame microscopico per BAAR positivo.
- Esami di laboratorio: modesta leucocitosi neutrofila. Dieci giorni dopo il ricovero sopraggiunge il referto dell'esame TB test A60: IgG molto positivo = U/ml 1390 (400-900).

Dopo 15 gg. di degenza sono giunti i referti del MTD positivo sia su pus che su espettorato.

Dopo 25 giorni di degenza sono pervenuti i referti dell'esame colturale su espettorato e su pus del linfonodo: positivi per mycobacterium tuberculosis sensibile ai comuni farmaci antitubercolari.

Dopo il ricovero ospedaliero, valutata la radiografia del torace, la provenienza della paziente, il lavoro precedente, era nato il sospetto di malattia tubercolare. Vista la negatività dell'esame microscopico per BAAR sull'espettorato, della mantoux, il risultato dell'emocoltura,

il persistere del dolore in regione lombare, oltre che l'aumento improvviso (1 giorno) della raccolta in regione latero-cervicale dx, l'ipotesi diagnostica non poteva essere confermata.

L'esame microscopico per BAAR su pus del linfonodo latero-cervicale dx. ha permesso la diagnosi certa di malattia infettiva e il conseguente trattamento specifico; tale diagnosi è stata confermata dai successivi referti degli esami eseguiti (esami culturali).

Terapia prescritta alla Paziente: Isoniazide, Rifampicina, Etambutolo, Piraldina, Streptomina.

Dopo circa 20 giorni di trattamento era quasi totalmente scomparso il dolore in regione lombare, con riduzione radiologica dell'ascesso, segno che anche questo era di natura tubercolare.

comunicazioni orali

SESSIONE 7

Il laboratorio di Microbiologia e il Bioterrorismo

Giovedì 10 giugno 2004, 14.45-16.45, Sala F

CO7.1

ALLESTIMENTO DI UNA PCR MULTIPLEX PER LA DIAGNOSI RAPIDA DI INFEZIONE DA ORTHOPOXVIRUS, HSV E VZV.

Carletti F.^{*}, Horejsh D.^{*}, Di Caro A.^{*}, Grolla A.[†], Czub M.[†], Petrosillo N.^{*}, Ippolito G.[✓], Capobianchi M.R.^{*}

^{*} Laboratorio di Virologia INMI 'Lazzaro Spallanzani'

^{*} II° Divisione Clinica INMI 'Lazzaro Spallanzani'

[✓] Dipartimento di Epidemiologia INMI 'Lazzaro Spallanzani'

[†] Laboratorio Nazionale di Microbiologia, Winnipeg, Canada.

Scopo: Lo spettro di un possibile attentato bioterroristico è frequentemente richiamato dalla cronaca nazionale ed internazionale. Tra gli agenti virali adatti ad un rilascio deliberato, il virus del vaiolo occupa sicuramente una posizione preminente. Lo scenario ipotizzabile sarebbe caratterizzato da un'elevata mortalità e morbidità, dovuta all'assenza di anticorpi nella popolazione più giovane, e alla difficoltà nel formulare precocemente una diagnosi eziologica. Dato il ritardo intercorrente tra l'inizio dell'infezione e la comparsa degli anticorpi, è necessario puntare allo sviluppo di metodi che consentano una rapida rilevazione dell'agente. L'isolamento virale su colture di tessuto è eseguibile solo in laboratori di massimo contenimento biologico. Le tecniche di biologia molecolare, sono preferibili in quanto associano, ad una elevata sensibilità e specificità, la possibilità di essere condotte anche in strutture che non posseggano tali laboratori. Pertanto abbiamo allestito una PCR multiplex in grado di rilevare, oltre alla presenza di Vaiolo e di altri Orthopoxvirus (OPV), anche HSV1, HSV2 e VZV, i

principali agenti virali coinvolti nella diagnosi differenziale.

Metodi: Sono stati disegnati tre set di primer caratterizzati da un comune profilo termico e pertanto utilizzabili con le stesse condizioni di amplificazione. Le regioni amplificate appartengono al gene *crmB* degli OPV all'ORF 29 di VZV e alla DNA polimerasi di HSV-1 e HSV-2. La sensibilità e specificità sono state determinate rispettivamente su standard molecolari e su campioni biologici.

Risultati e conclusioni: Il metodo da noi allestito è risultato rapido, sensibile e specifico. Le differenti specie di OPV possono essere identificate mediante successiva analisi con RFLP o sequenziamento. Il metodo può essere utile anche per identificare eventuali epidemie di OPV diverse dal Vaiolo ed è eseguibile in condizioni di basso rischio biologico.

comunicazioni orali

SESSIONE 8

Nuovi argomenti in Micologia e in Parassitologia

Venerdì 11 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala D

CO8.1

LA CROMOBLASTOMICOSI IN UNA REGIONE DEL SUD MADAGASCAR

Sanlorenzo M.[°], Bruno R.[°], Lasagna C.[°],
Cornacchiari M.[°], Crema F.[°], Caldera D.[°],
Grosjean P.^{***}, Rajeamiarimoelisoa C.^{***}

* A.S.L. 7 Chivasso (To)

° Equipe Sanitaria Ospedale "S. Croix" Isoanala
(Madagascar)

*** Istituto "Pasteur" di Antananarivo (Madagascar)

Introduzione:

La cromoblastomicosi è una infezione del derma e del tessuto sottocutaneo. I miceti responsabili appartengono alla famiglia delle Dematiaceae e sono distribuiti ubiquitariamente nel mondo, seppure la patologia sia più comune nelle regioni tropicali.

Il Madagascar rappresenta il paese con il maggior numero di casi notificati.

Materiali e metodi:

Da gennaio 1998 a dicembre 2003 presso l'ospedale S. Croix di Isoanala (sud Madagascar) sono stati osservati 18 casi di cromoblastomicosi (15 maschi e 3 femmine con età media di 45,9 anni). La diagnosi è stata effettuata mediante biopsie multiple delle lesioni ed esame istologico con il riscontro dei caratteristici "corpi sclerotici". In 4 casi si è proceduto anche all'esame colturale per l'identificazione della specie fungina.

14 pazienti presentavano lesioni estese con aspetto a "cavolfiore", secernenti un liquido denso e giallastro; 4 soggetti mostravano invece lesioni rilevate con aspetto nodulare, non secernenti, aderenti ai piani più profondi del sottocute.

La localizzazione è stata in 3 pazienti unica e monolaterale (arti inferiori), in tutti gli altri abbiamo osservato lesioni multiple.

Terapia e risultati:

L'esame colturale ha evidenziato in 3 soggetti un'infezione da *Cladophialophora carrionii*, mentre un caso è rimasto di dubbia identificazione.

Due pazienti, di sesso femminile e con lesioni nodulari, sono state trattate chirurgicamente con asportazione delle lesioni e successiva terapia: un caso con ketoconazolo 200 mg/die per tre mesi e poi, per recidiva, per ulteriori tre mesi; l'altro con terbinafina 250 mg x2/die per due mesi e 250 mg/die per ulteriori 6 mesi).

Tutti gli altri soggetti sono stati trattati solo farmacologicamente: 2 con ketoconazolo 200 mg/die per 5 mesi; 1 con amfotericina B 500 mg x3/die per 3 mesi e i restanti 13 con terbinafina 250 mg x2/die per 2 mesi e 250 mg/die per 6 mesi).

Durante la terapia sono stati effettuati controlli periodici della crasi ematica e della funzionalità epatica e renale.

Attualmente 15 pazienti hanno terminato la cura: 10 risultano completamente guariti, 5 presentano una regressione delle lesioni.

Conclusioni:

La diagnosi di cromoblastomicosi è stata sempre confermata istologicamente e, in quattro casi, anche con esame colturale.

Nel corso del periodo considerato sono stati utilizzati differenti schemi terapeutici in mancanza di univoci e codificati protocolli internazionali: il trattamento con terbinafina ha presentato i migliori risultati clinici e nessun significativo effetto collaterale.

BIBLIOGRAFIA

1. Esterre P., Andriantsimahavandy A., Raharisolo C.: Histoire naturelle des Chromoblastomycoses à Madagascar et dans l'Océan indien. Bull. Soc. Pathol. Exot. 1997; 90 (5): 321-327
2. Esterre P., Andriantsimahavandy A., Ramarcel E.R., Pecarrere J.K.: Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar. A review. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1996 Jul; 55 (1): 45-47

CO8.2

QUANTIFICAZIONE MEDIANTE REAL-TIME PCR DI GENI DI TOXOPLASMA GONDII IN PAZIENTI AIDS CON ENCEFALITE TOXOPLASMICA (ET) RIATTIVATA

**Seraceni S., Eudes* N., Peyron F. *,
Giuliodori M., Marchetti D., Cultrera R.,
Contini C.**

Sezione di Malattie Infettive, Dipartimento di Medicina
Clinica e sperimentale, Università di Ferrara.

*Laboratoire de Parasitologie et Pathologie Exotique,
Université Claude Bernard, Lyon, France

La Real-time PCR è stata finalizzata principalmente alla ricerca del gene B1 di *T. gondii*, mentre non sono stati finora esplorati geni coinvolti nello switch bradizoita-tachizoita della fase di riattivazione dell'infezione, in pazienti con AIDS.

Obiettivi. Ci siamo prefissi lo scopo di quantificare tramite Real-time PCR (Light Cycler, Roche) la presenza di geni di *T. gondii* stadio-specifici (SAG4, MAG1) in campioni di liquor cefalorachidiano (LCR) di pazienti AIDS con ET, precedentemente testati in n-PCR (1).

Metodi. Sono stati analizzati 39 LCR da 34 pazienti con AIDS (1° episodio di ET o riattivazione). La Real-Time Lyght Cycler PCR (LC-PCR) è stata eseguita impiegando l'LC FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche). La curva dello standard (CS), inserita in ogni Real-time come riferimento, è stata ottenuta clonando i prodotti PCR amplificanti i diversi geni (B1, SAG4, MAG1), del ceppo di controllo RH di *T. gondii*. I risultati sono stati espressi esaminando la soglia di rilevazione del segnale di fluorescenza (Crossing point -Cp). Il Cp di ogni campione è stato rapportato alla concentrazione del parassita ottenuta dalla CS, ottenendo per interpolazione, la quantificazione di *T. gondii*.

Risultati: 18 (46%), 12 (31%) e 16 (41%) positività sono state riscontrate con la n-PCR per i geni B1, SAG4 e MAG1, rispettivamente; 20 (51%), 9 (23%) e 12 (31%) positività sono state invece ottenute con la LC-PCR per gli stessi geni. Valori percentuali concordanti sono stati ottenuti con entrambe le metodiche con ciascun gene in un'elevata percentuale di casi. In generale, percentuali di positività e statisticamente significative sono state ottenute nei pazienti con recidive di ET rispetto a quelli con 1° episodio.

Conclusioni. L'LC-PCR è apparsa più specifica della n-PCR. La CS tuttavia influisce sulla sensibilità della quantificazione. Infatti, mentre per il gene B1 la concentrazione protozoaria captata con l'LC-PCR è risultata assai bassa (circa 10^3), per i geni SAG4 e MAG1,

si è dimostrata più elevata, (10^3 - 10^4). L'applicazione della LC-PCR effettuata con geni bradizoita specifici può assumere un importante valore nel determinare la carica di DNA parassitario e la sua cinetica nei diversi momenti dell'infezione ed in particolare in pazienti che hanno praticato terapia o profilassi specifica.

BIBLIOGRAFIA

1. Contini C., et al. The role of stage-specific oligonucleotide primers in providing effective laboratory support for the molecular diagnosis of reactivated *Toxoplasma gondii* encephalitis in patients with AIDS. *J Med Microbiol* 2002; 51: 879-890.

Lavoro eseguito con i contributi di FEMS Fellowship prize (2003-2004), MIUR 2003, CARIFE e CARICE (2003-2004)

CO8.3

PARASSITOSI INTESTINALE ASSOCIATA A SPIROCHETOSI INTESTINALE: DESCRIZIONE DEI PRIMI CASI.

**Calderaro A., Incaprera M., Bommezzadri S.,
Piccolo G., Zuelli C., Villanacci V.,
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;
Secondo Dipartimento di Patologia Chirurgica,
Spedali Civili, Università degli Studi di Brescia.

Infezioni miste da patogeni intestinali coinvolti nell'insorgenza di malattie gastrointestinali compaiono frequentemente nei paesi con basse condizioni igienico-sanitarie e spesso rimangono non diagnosticate a causa della mancanza di adeguati metodi di laboratorio. In questo lavoro descriviamo 7 casi di spirochetosi intestinale da *Brachyspira pilosicoli* e/o *Brachyspira aalborgi* associata a parassiti in pazienti immigrati o italiani viaggiatori in paesi in via di sviluppo che presentavano diarrea persistente e dolori addominali di incerta eziologia.

Vengono descritti casi di spirochetosi intestinale da *B. pilosicoli* associati alla presenza di parassiti patogeni (*Giardia intestinalis* e *Schistosoma mansoni*), casi di spirochetosi intestinale da *B. aalborgi* associata a protozoi patogeni (*Giardia intestinalis*) e casi di spirochetosi intestinale da *B. pilosicoli* + *B. aalborgi* associata a protozoi patogeni (*Entamoeba histolytica*).

Inoltre, vengono descritti casi di spirochetosi intestinale associata a protozoi non patogeni (*Chilomastix mesnili* e *Entamoeba dispar*) o ad incerta patogenicità (*Blastocystis hominis*).

In tutti questi casi l'associazione tra i metodi tradizio-

nali (osservazione microscopica ed esame colturale) e le indagini molecolari (RFLP-PCR per l'identificazione delle spirochete e PCR per l'identificazione di *E. histolytica* ed *E. dispar*), condotte direttamente sui campioni biologici (feci e biopsie coliche), ha consentito una rapida e corretta diagnosi.

La descrizione di questi casi vuole soprattutto richiamare l'attenzione sul ruolo fondamentale che hanno assunto le indagini molecolari nel Laboratorio di Microbiologia Clinica. Nei casi descritti infatti, hanno permesso di porre una rapida e corretta diagnosi consentendo anche di escludere in un caso il sospetto di morbo di Chron.

Per questo motivo abbiamo valutato un ulteriore saggio di nested-PCR (nested-PCR 2002) recentemente descritto in letteratura appositamente per la identificazione di plasmodi della specie *P. ovale* mutati nel gene 18S. Verranno a questo proposito descritti i risultati ottenuti analizzando campioni di pazienti con sospetta malaria mediante nested-PCR 2002 comparativamente ai saggi nested-PCR 1993 e Real-time PCR, al fine di verificare quale saggio tra questi possa essere il più affidabile e specifico da utilizzare per la diagnosi di laboratorio di malaria come supporto all'indagine microscopica.

CO8.4

VALUTAZIONE DI METODI DI RIFERIMENTO PER LA DIAGNOSI MOLECOLARE DI MALARIA

Calderaro A., Piccolo G., Zuelli C., Perandin F.¹, Manca N.¹, Ricci L.², 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;

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata,
Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia;

²Arcispedale di Reggio Emilia.

Negli ultimi due anni presso il nostro laboratorio sono stati messi a punto e valutati diversi saggi molecolari da affiancare all'indagine microscopica, tutt'ora metodo di riferimento per la diagnosi di laboratorio di malaria, ma poco sensibile e poco specifico. In particolare, saggi di nested-PCR (nested-PCR 1993), real-time-PCR e PCR seguita da ibridazione in micropiastra, si sono rivelati altamente sensibili, specifici e capaci di svelare infezioni miste non rivelate dalla microscopia. Inoltre, i saggi di PCR si sono dimostrati utili anche per aggiornare l'epidemiologia locale della malaria d'importazione. In particolare, grazie a queste indagini molecolari, è stato osservato a Parma un aumento della prevalenza delle infezioni da *Plasmodium ovale*, anche in accordo con i dati nazionali.

Le indagini molecolari da noi valutate hanno mostrato risultati concordanti tra loro nei casi di infezione da *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, mentre hanno mostrato risultati discordanti in presenza di infezioni da *P. ovale*. Questo risultato è verosimilmente dovuto alla presenza di mutazioni puntiformi nel gene 18S rDNA di *P. ovale*, come già riportato ampiamente in letteratura, che possono interferire con i saggi di PCR aventi questo gene come bersaglio. Di conseguenza nessuno dei tre saggi da noi valutati può essere considerato un saggio di riferimento molecolare per la specie *P. ovale*.

comunicazioni orali

SESSIONE 9

Biotecnologie emergenti nella diagnostica microbiologica e virologica

Venerdì 11 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala F

CO9.1

ANALISI DELL'INTEGRAZIONE DEL DNA DI HPV16 IN CAMPIONI CERVICALI MEDIANTE PCR QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Cricca M., Venturoli S., Ambretti S., Bonvicini F., Gallinella G., Musiani M., Zerbini M.

Dipartimento di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale - Divisione di Microbiologia, Università di Bologna, Via Massarenti 9, 40138

Obiettivi:

L'integrazione del DNA di HPV16 nel genoma umano è un evento implicato nella progressione delle lesioni preneoplastiche a carcinoma cervicale invasivo. L'integrazione comporta l'interruzione delle ORF E1/E2 e la conseguente sovraespressione delle oncoproteine E6 ed E7. Studi recenti hanno dimostrato che l'integrazione non è sempre un evento tardivo nella progressione dell'infezione e che lo stato integrato dell'HPV16 in CIN di basso grado ha un valore predittivo positivo per la progressione neoplastica.

Nel presente studio sono stati allestiti saggi di PCR qualitativa per mappare le regioni delle ORF E1/E2 più frequentemente interrotte e saggi quantitativi per determinare lo stato fisico del DNA di HPV16 in lesioni cervicali di diverso grado e in carcinomi microinvasivi.

Materiali e metodi:

I campioni citologici sono stati analizzati mediante un saggio di PCR qualitativa per l'amplificazione di 4 frammenti overlapping che coprono l'intera ORF E1 e di due frammenti overlapping che coprono l'intera ORF E2.

Successivamente sono stati allestiti saggi di PCR real time per l'amplificazione di un frammento di 242 bps interno al gene E2, nella regione più frequentemente

interrotta (hinge region) e di un frammento di 130 bps interno al gene E6.

Risultati:

Il 95% dei campioni sono risultati positivi ad entrambe le ORF (E1/E2) in PCR qualitativa, mentre il 5% dei campioni sono risultati negativi per l'estremità 3' della ORF E1 e per l'intera ORF E2.

La quantificazione relativa dell'E2 rispetto all'E6 ha consentito di determinare lo stato fisico di HPV16 confermando l'integrazione del DNA nel 5% dei campioni e dimostrando la presenza di DNA virale, sia allo stato episomiale sia allo stato misto, nel rimanente 95% dei campioni.

Conclusioni:

I saggi di PCR qualitativa e quantitativa da noi messi a punto, permettono di determinare lo stato fisico e la carica virale in pazienti con infezione da HPV16, parametri questi che consentono di valutare in termini prognostici la progressione della lesione o la clearance virale.

CO9.2

TECNICA DI AMPLIFICAZIONE REAL TIME NEI TUMORI ED IN NUOVE ENTITÀ PATOLOGICHE HHV8-ASSOCIATI

Tedeschi R., Bidoli E.*, Bortolin M.T., Pratesi C., D'Andrea M., Averna P., Varaschin P., Crepaldi C., Simonelli C.°, De Paoli P.

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

Introduzione e Scopo. HHV-8 è l'ultimo Herpesvirus, identificato nel 1994 in biopsie di pazienti AIDS con sarcoma di Kaposi (KS). Oltre al KS, è stata descritta l'associazione del virus con due distinte patologie linfoproliferative, quali Primary Effusion Lymphoma

(PEL) e Multicentric Castleman Disease (MCD) e, di recente, con linfomi solidi associati a MCD o AIDS-KS (LS). Controverso è il ruolo di HHV8 nel Mieloma Multiplo (MM). Scopo dello studio è stato quello di valutare e confrontare la viremia HHV8 nei pazienti con diversa patologia HHV8-relata e di correlarla con altri parametri virologici (viremia EBV, HIV), sierologici (reattività anticorpale HHV8) e immunologici (conta CD4).

Materiali e Metodi.

Campioni di plasma, siero e PBMCs sono stati raccolti durante il follow-up clinico in 40 pazienti KS-AIDS, 4 KS classici, 5 PEL, 8 MCD, 4 LS (3 HIV+, 1 HIV-). Uno studio prospettico per l'insorgenza di MM (1961 soggetti con 250 casi) è anche stato valutato. La viremia HHV8 ed EBV è stata valutata con metodica real time PCR (Tedeschi et al J Clin Microbiol 2001), la viremia HIV mediante metodica b-DNA (Bayer) e la conta dei CD4 in citofluorimetria, la sierologia HHV8 in IFA.

Risultati.

Alta viremia plasmatica HHV8 era presente nei KS sia prima che durante HAART (mediana, 8998 e 12270cp/ml); i livelli di HHV8 DNA correlavano con livelli di HIV RNA (OR:5.40, 95%CI:1.54-18.98) e con la conta CD4 (OR:7.24, CI95%:1.30-40.35). Nei PEL era presente viremia HHV8 elevata allo sviluppo della malattia in 5/5 pz (mediana, 10284cp/ml) e durante il follow-up clinico (mediana, 2078cp/ml), osservando una correlazione con un progressivo calo dei CD4 ($p < 0.01$). EBV DNA era presente in 3/5 pz (mediana, 3196 cp/ml) e in 4/5 pz durante il follow-up (mediana, 598 cp/ml). Negli 8 MCD erano presenti livelli HHV8 DNA più elevati rispetto EBV DNA (mediana 4350cp/ml e 40cp/ml, rispettivamente). Le caratteristiche istologiche, virologiche e cliniche dei LS sono in corso di studio. Reattività HHV8 era presente in 7/1961 pz dello studio MM senza HHV8 viremia rilevabile.

Considerazioni Conclusive.

La determinazione molecolare di HHV8 permette di associare nuove entità patologiche a questo virus, rappresenta uno strumento utile nel follow-up clinico dei pazienti con tumori HHV8 associati e consente di studiare le interazioni patogenetiche con altri virus tumore- associati.

CO9.3

DIAGNOSTICA DIFFERENZIALE PRECOCE DEL SARS CORONAVIRUS CON METODICA MICRO-ARRAYS NELLE SINDROMI ACUTE RESPIRATORIE

Giannattasio A., *Marzo C., *Guarino C., Falco E., **De Montis A., **Lauterio C., Alterio A., **Scarpati S., *Bellitti F., Smeraglia R.**

Virologia P.O. "C. Ascalesi": Direttore Prof. Riccardo Smeraglia - A.S.L. Napoli 1,

**I Clinica Pneumologica II Università di Napoli P.O.*

Monaldi,

*** BCS Biotech SpA Laboratori di Ricerca e Sviluppo*

Cagliari,

****Ospedale S. Maria delle Grazie Pozzuoli (NA) - A.S.L.*

Napoli 2

Lo scopo della nostra ricerca è quello di poter effettuare una tempestiva diagnosi differenziale per il SARS Coronavirus nei confronti degli altri virus (Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1-2-3, RSV, Adenovirus) responsabili di sindromi respiratorie acute.

Lo studio in esame è stato condotto su 12 pazienti affetti da varie patologie respiratorie, utilizzando il metodo con Micro-Arrays. Nei primi 5 pazienti la ricerca dei virus respiratori, compreso il Coronavirus SARS, è stata eseguita su: liquido di lavaggio bronco-alveolare (BAL), su broncoaspirato e su siero; nei restanti 7 pazienti l'esame è stato effettuato solo su campioni di siero.

Il metodo con Micro-Arrays, o DNA/RNA chips, è un sistema diagnostico innovativo che consente di identificare simultaneamente il genoma (o una sequenza nota) degli 8 virus potenzialmente responsabili della sindrome respiratoria acuta. La caratteristica peculiare del metodo è l'ibridizzazione del genoma virale, o parte di esso, all'interno di pozzetti di circa 2x2 cm. Tale metodica permette l'identificazione dei virus in questione dopo 1-2 giorni dall'infezione.

Dei primi 5 pazienti esaminati: 2 sono risultati positivi per RSV nel BAL e nel broncoaspirato, uno positivo per RSV nei tre liquidi biologici presi in esame, uno positivo per Influenza A nel BAL e nel broncoaspirato e uno è risultato completamente negativo. Per quanto concerne gli altri 7 sieri: 2 sono risultati positivi all'Adenovirus, uno positivo a Parainfluenza 1 e Adenovirus, uno positivo a RSV e Influenza B, uno debolmente positivo all'RSV e 2 positivi all'RSV.

I dati da noi ottenuti dimostrano che il metodo con Micro-Arrays permette di porre una rapida diagnosi differenziale per il SARS Coronavirus nei confronti degli altri virus respiratori. Ci piace sottolineare, però,

che tale metodo consente al clinico di avere una diagnosi certa di patologia respiratoria infettiva all'insorgere dei primi sintomi, da affiancare alla ricerca anticorpale (IgG, IgM, IgA) su siero.

CO9.4

CONFUTAZIONE DI RECENTI IPOTESI ETIOLOGICHE PER LA PITIRIASI ROSEA DI GIBERT

Urbano F.¹, Azzi A.², Zakzewska K.², De Santis R.², Zuccati G.³, Urbano P.²

¹ Ispettorato R.F.C. dell'Esercito, Sezione Logistica - Servizio Sanitario;

² Dipartimento di Sanità Pubblica, e

³ Dipartimento di Scienze Dermatologiche, Università di Firenze

La pitiriasi rosea di Gibert è una dermatosi infiammatoria acuta, con caratteristiche epidemiologiche, cliniche e istopatologiche tipiche. Il dato epidemiologico classico depone per la sua contagiosità. L'origine infettiva è ammessa quasi unanimemente, ma l'agente etologico non è ancora stato identificato.

Nel 1997 è stato ipotizzato un ruolo etiopatogenetico per il parvovirus umano B19, che non ha trovato conferme da indagini sierologiche. Sempre nel 1997 sono stati considerati i virus erpetici umani 6 e 7, e sono stati ottenuti risultati suggestivi per l'implicazione di HHV7, con tecniche di biologia molecolare.

Scopo del lavoro

Verificare alcune delle ipotesi etiologiche su questa patologia relative ad agenti di recente identificazione e suscettibili di studio solo con tecniche biomolecolari avanzate: Parvovirus B19, HHV-7 e HHV-8.

Materiali e metodi

Sono stati arruolati nello studio venti militari (maschi, fra 18 e 33 anni) che hanno dato il consenso informato, di 22 presentatisi consecutivamente con forme clinicamente classiche in fase di eruzione secondaria al Reparto di Dermatologia e Venereologia del Policlinico Militare di Roma fra il Giugno del 1997 ed il Gennaio del 1998. Sono stati raccolti campioni di siero in fase acuta, 9 sieri di follow up, e dieci sieri di controlli sani.

Nested PCR per Human Herpes Virus 7 e per Human Herpes Virus 8, seguita da analisi elettroforetica dei prodotti della PCR; NAT e sierologia per Parvovirus Umano B19.

Risultati

Tutti i sieri sono risultati negativi alla sensibilissima nested PCR per HHV-7, per HHV-8 e per Parvovirus Umano B19.

Tutti i sieri sono risultati negativi alla ricerca di anticorpi anti Parvovirus umano B19 della classe IgM. Per gli anticorpi di classe IgG sono risultati positivi 15/20

casi acuti; 6/9 casi al follow up e 6/10 sieri dei controlli sani.

Conclusioni

Aggiungiamo HHV-8 alla lista degli agenti per i quali i dati sperimentali non appoggiano l'ipotesi di un coinvolgimento patogenetico nella dermatosi oggetto di indagine; confermiamo che il parvovirus umano B19 non è implicato nella patogenesi della pitiriasi rosea; neghiamo la presenza di HHV-7 nel siero dei soggetti affetti da pitiriasi rosea di Gibert, mettendo in discussione la tesi che vedeva tale virus in rapporto causale con questa patologia.

Col contributo di ricerca 'ex60%' del MIUR.