

# relazioni

## SESSIONE I

### Il Piano Nazionale della Microbiologia: l'evoluzione della rete assistenziale

Martedì 19 Settembre 2006, ore 14.00 - 18.00, Sala BERLINO

#### S1.1

#### **PATOLOGIE DA INFEZIONE E DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA: EVIDENZE EPIDEMIOLOGICHE ED ASSISTENZIALI**

**Magliano E.**

*Dipartimento di Sanità Pubblica - Microbiologia - Virologia,  
Università degli Studi di Milano*

Secondo le più recenti stime dell'OMS oltre il 33% della mortalità annuale nel mondo può essere messo direttamente in relazione alle malattie infettive (contro il 29% delle patologie cardiovascolari ed il 12% dei tumori).

Se si aggiungono le conseguenze di infezioni pregresse (es: malattie cardiache post-streptococciche), i gravi danni indotti da infezioni croniche (es: epatocarcinoma, carcinoma della cervice uterina, patologie gastriche, ecc.), la possibile noxa patogena nella genesi di forme degenerative (es: aterosclerosi) e le drammatiche complicanze infettive in pazienti immunocompromessi o fragilizzati, appare evidente come le patologie da infezione rappresentino uno dei più importanti capitoli della medicina odierna.

Il nuovo scenario è condizionato da numerosi fattori legati all'ospite, al parassita ed all'ambiente, la cui conoscenza è indispensabile al microbiologo clinico, che, forte di sempre più eccezionali strumenti operativi, deve attivare interventi preventivi e diagnostico-terapeutici efficaci in un contesto epidemiologico ed organizzativo - assistenziale che ha subito di recente grandi trasformazioni.

Dal punto di vista epidemiologico, l'emergenza di nuovi agenti infettivi (oltre 30 negli ultimi vent'anni, di cui 2/3 zoonosi), e la riemersione di vecchi agenti, richiedono al microbiologo conoscenze sulla genetica delle mutazioni microbiche, informazioni sui cambia-

menti del serbatoio animale e dei vettori, allerta sui fenomeni demografici e sui rischi legati al rapido trasferimento di individui da un paese all'altro in un contesto di profondi cambiamenti ecologici ed ambientali in atto.

Da un punto di vista organizzativo - assistenziale, negli ultimi anni si sono verificati importanti modifiche di cui il microbiologo deve tenere conto nella sua attività in Sanità Pubblica.

In ambito assistenziale nosocomiale, l'impegno per garantire risultati diagnostici e di indirizzo terapeutico ottimali in tempi rapidi, in un network collaborativo con i clinici, promuovendo parallelamente la sorveglianza dell'emergenza infettiva e delle resistenze agli antibiotici, trova difficoltà in una realtà di riduzione delle risorse che opprime lo sviluppo autonomo della microbiologia clinica e costringe a strategie di interconnessioni intradisciplinari funzionali.

Nell'ambito assistenziale comunitario, si sono verificati importanti cambiamenti legati alla dimissione precoce dei pazienti dagli ospedali con l'utilizzo di strutture di lunga degenza, riabilitative e di assistenza alla persona in cui il ruolo del microbiologo clinico necessita di ulteriore promozione.

A ciò si aggiunge la necessità di incrementare il contatto ed il supporto microbiologico con il medico di medicina generale, che si trova sempre di più a gestire degenze complesse, con fenomeni di antibiotico-resistenza comunitaria, e con patologie da importazione.

Negli aspetti assistenziali sociali non dimentichiamo che i laboratori di microbiologia sono allertati per grandi calamità naturali (pandemia) o indotte (bioterrorismo).

L'AMCLI è attenta a questa evoluzione ed intende promuovere il ruolo del microbiologo clinico a diversi livelli sinergici e complementari, dall'ottimizzazione delle prestazioni in percorsi diagnostico-terapeutici integrati, allo studio di organizzazioni del laboratorio di microbiologia a diversi livelli di complessità tenendo conto degli aspetti di network collaborativo con altre discipline, al fine di proporre alle Istituzioni uno

strumento di programmazione sanitaria che salvaguardi la nostra disciplina.

## S1.4

### IPOTESI DI NETWORK COLLABORATIVI NELLE PATOLOGIE DA INFEZIONE

**Lauria F.N.**

*Ist. Nazionale Malattie Infettive "L.Spallanzani" Roma*

#### Un network microbiologico nella prospettiva di una gestione integrata delle patologie infettive

La gestione delle patologie infettive è strettamente collegata con le informazioni fornite dal laboratorio di Microbiologia. Richiede spesso interventi di carattere globale, dove gli interventi di, prevenzione, trattamento, riabilitazione e cura sono integrati fra loro, caratterizzano sia i processi assistenziali della fase acuta che della fase cronica, e possono riguardare specifici contesti e situazioni; ad esempio:

1. contesti socioeconomici: (malattie infettive della popolazione immigrata: 10% delle patologie riscontrate);
2. abitudini sociali e vita di relazione (malattie sessualmente trasmesse);
3. condizioni fisiologiche (malattie infettive in gravidanza);
4. emergenze sociali (bioterrorismo);
5. emergenze epidemiche (SARS, influenza aviaria);
6. condizioni cliniche (infezioni negli immunocompromessi);
7. gestione dei trattamenti e terapie attuate (terapia antibiotica);
8. patologie ad andamento cronico evolutivo (HIV/AIDS, epatiti virali croniche)

L'obiettivo di un percorso diagnostico-terapeutico integrato è quello di raggiungere e migliorare determinati standard assistenziali, ridurre la variabilità clinica, migliorare la comunicazione interdisciplinare e con il paziente, accrescere la soddisfazione del paziente nei riguardi della qualità delle cure erogate.

Per definire concretamente una strategia più efficace e più strettamente coerente dal punto di vista clinico è indispensabile procedere da tre presupposti fondamentali:

- a. Adottare per quanto possibile scelte e interventi preventivi, diagnostici, terapeutici, riabilitativi, per i quali siano disponibili ragionevoli evidenze di efficacia.
- b. La valutazione di appropriatezza non può essere basata solo sul concetto di appropriata indicazione all'utilizzo di una determinata tecnologia in uno specifico contesto clinico, ma deve tener conto dei rischi connessi alla sua utilizzazione. Il mix di pre-

stazioni erogate deve essere specifico ed adattato alle caratteristiche cliniche del paziente, capace di ottimizzare il rapporto benefici/rischi.

- c. L'aumento esponenziale delle conoscenze scientifiche e delle loro applicazione nella pratica clinica, ha progressivamente ridotto fino ad annullare il modello decisionale del medico fondato sul prototipo del grande gesto diagnostico o terapeutico.

Un modello di *network* microbiologico è innanzitutto utile come risorsa per diffondere informazioni ed ha come obiettivo primario il sostegno della comunicazione tra microbiologi e tra quanti operano nel campo delle biotecnologie. L'impatto delle biotecnologie in diagnostica si è innanzi tutto avvertito nel settore delle malattie infettive, sia di origine virale che batterica.

E' evidente che l'introduzione di nuove tecnologie sanitarie nei diversi contesti è caratterizzata da un aumento della complessità organizzativa. E' altresì evidente che i processi organizzativi delle tecnologie sanitarie così come delineati non sono di facile attuazione, in quanto necessitano di una applicazione graduale e, probabilmente, esistono una serie di barriere ed ostacoli al cambiamento. Barriere che possono essere ambientali e che riguardano la pratica clinica corrente, limiti temporali e organizzativi, i necessari processi di formazione ed aggiornamento delle professionalità; oppure la semplice mancanza di strutture adeguate, programmi o di nuove risorse allocate.

#### Utilità di un modello di rete funzionale dei servizi di microbiologia:

E' innanzitutto necessario definire compiutamente le caratteristiche delle prestazioni diagnostiche di microbiologia e i livelli di complessità del laboratorio coinvolto.

In questa prospettiva, è utile la costruzione di modelli di riferimento per la diagnostica nel campo delle principali patologie infettive integrati con la gestione clinica, con l'obiettivo dell'eccellenza e della continuità assistenziale.

Pertanto, la rete funzionale dei laboratori di microbiologia deve avere i seguenti obiettivi:

1. costruzione ed adozione di modelli di gestione integrata delle malattie infettive e della diagnostica microbiologica nella continuità ospedale-territorio
2. realizzazione di network di laboratori di microbiologia caratterizzati da diversi livelli di competenza scientifica, tecnico-organizzativa e clinica
3. definizione di un appropriato uso delle prestazioni microbiologiche.

Il modello organizzativo di collegamento in rete funzionale dei laboratori di microbiologia, attuabile anche nei singoli contesti regionali identifica:

- a. gli aspetti fondamentali di carattere organizzativo;
- b. fattori determinati la complessità organizzativa e tecnica dei laboratori.
- c. indicatori di processo in grado di misurare le complessità evidenziate.

**S1.5****LA MICROBIOLOGIA CLINICA  
IN EUROPA;  
L'ESPERIENZA OLANDESE****Degener J.E.**

*Head of Department  
Medical Microbiology  
University Medical Center Groningen - Netherlands*

In 1962 the section Medical Biopathology was established under the umbrella of the UEMS (European Union of Medical Specialists). The UEMS is a lobby organisation covering the interests of medical specialists in the European Union. A number of laboratory specialities was brought under this umbrella, among these Medical Microbiology. Those countries in the European Union recognising Medical Microbiology as an independent speciality can delegate Medical Microbiologists to the section (Medical Biopathology). At this moment 12 countries are sending delegates who convene in the Medical Microbiology commission of the section.

The section of Medical Biopathology stands for standardisation of the structure of training, making fellowships available and a free movement of professionals throughout the European Union.

In 1996 the main tasks in Medical Microbiology were formulated in Helsinki, among these: providing the scientific basis for laboratory diagnosis, consultation and diagnosis, treatment and prevention of infection, infection control, and laboratory management.

These tasks are the basis of the core training programme on which the commission decided and which is available on the Website (UEMS and NVMM) opzoeken.

The Dutch Society of Medical Microbiology was established in 1991 after a merge of the Society of Laboratory Physicians and the Dutch Society for Medical Microbiology. The first being an association covering the professional interests and the latter a scientific society. Medical Microbiologists in the Netherlands who are for a hundred percent participating in this highly productive and professional society are trained and are fulfilling their profession according to the guidelines of the UEMS. During the presentation examples will be shown of the structure of training and of the profession in the Netherlands.

**S1.6****IL PIANO NAZIONALE PER LA  
MICROBIOLOGIA CLINICA:  
UNO STRUMENTO PER LA  
PROGRAMMAZIONE SANITARIA****Spanò A., Cerbo M.°**

*U.O.C. Microbiologia, Virologia e Immunologia  
Ospedale S. Pertini, RMB - Roma  
° ASSR Agenzia per i Servizi Sanitari Regionali - Roma*

Le questioni centrali che i microbiologi debbono considerare per il futuro qualificato della Microbiologia Clinica in Italia sono costituite dalla misurazione dell'impatto della Microbiologia sulla diagnostica in generale e sulle malattie infettive in particolare, nonché dalla considerazione del sempre più frequente riscontro di nuovi patogeni come responsabili di patologie prima non identificate/correlate come tali. Si tratta in altre parole, considerando il livello attuale della diagnostica delle patologie da infezione e le evidenze della ricerca e degli studi di settore, di arrivare a definire un assetto autonomo della Microbiologia Clinica all'interno delle strutture assistenziali, riconoscendone l'impatto assistenziale e la specificità, affidando finalmente allo specialista microbiologo un ruolo centrale in tale contesto. Gli strumenti di tale processo sono perciò costituiti dalla previsione di una autonoma strutturazione dei servizi di microbiologia nell'SSN, organizzati in rete e classificati per il livello di complessità tecnologico-organizzativa ed assistenziale. Per i fini descritti è nato il progetto di ricerca finalizzata ex art. 12 bis D.Lgs 502/92 riconosciuto quale area specifica di ricerca sanitaria. Gli obiettivi della ricerca sono appunto costituiti dalla definizione dei modelli di gestione delle patologie infettive in percorsi assistenziali integrati in una logica di continuità ospedale-territorio, e dalla identificazione dei correlati livelli di organizzazione dei servizi di microbiologia. Obiettivi secondari del progetto sono la messa a punto di criteri e metodi di classificazione delle prestazioni correlate ai processi assistenziali integrati e la messa a punto di indicatori in grado di misurare complessità organizzativa e livello specialistico dei laboratori da costituire e coinvolgere nel processo diagnostico-terapeutico. Il progetto prevede di operare attraverso unità operative regionali, coordinate dall'ASSR e di iniziare nel corso del 2006 le attività di ricerca attraverso l'utilizzo di un questionario conoscitivo da somministrare alle strutture per il tramite delle UU.OO. regionali. Il trasferimento dei risultati finali della ricerca alla programmazione sanitaria regionale costituisce l'opportunità più concreta ed operativa per riconoscere la Microbiologia Clinica come struttura assistenziale essenziale nel SSN.

# relazioni

## SESSIONE 2

### Il Laboratorio di Microbiologia e la gestione delle infezioni in ambito nosocomiale e comunitario

Martedì 19 Settembre 2006, ore 14.00 - 18.00, Sala GIALLA

#### S2.1

#### RUOLO E RESPONSABILITÀ DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA

**Marchiaro G.**

*S.C. Microbiologia, ASO S. Giovanni Battista, Torino*

I profondi cambiamenti in corso nelle organizzazioni sanitarie dei paesi industrializzati, caratterizzati soprattutto dalla deospedalizzazione precoce, dallo sviluppo della Day Surgery e del Day Hospital, dall'incremento delle strutture di lungodegenza e di riabilitazione, estendono i problemi della gestione delle infezioni all'ambiente extraospedaliero e determinano uno stretto legame tra i problemi presenti all'interno e all'esterno dei nosocomi.

A questo si devono aggiungere le emergenze sanitarie a cui ci hanno abituato i mezzi di informazione, la globalizzazione e le esigenze dei cittadini di avere risposte rapide e convincenti.

Alla luce, dunque, di una realtà profondamente mutata il Laboratorio di Microbiologia clinica (LMC) deve affrontare problemi organizzativi nuovi, sviluppare nuove competenze e svolgere un ruolo di riferimento nel Servizio Sanitario.

In particolare in ambito ospedaliero, è noto che LMC non si limita al solo compito diagnostico e di indirizzo per la terapia antinfettiva, ma il suo ruolo si articola in attività più complesse quali la sorveglianza e il controllo degli "alert organism", lo studio delle epidemie, la sorveglianza delle antibioticoresistenze. Queste attività non dovrebbero differire sostanzialmente dai nuovi compiti che vengono richiesti anche sul territorio.

La responsabilità di garantire la "qualità del dato microbiologico" impone al LMC, non solo di dotarsi di strumenti tecnologici avanzati, ma di sviluppare strategie di comunicazione che superino i confini dell'Ospedale e giungano negli studi dei Medici di Medicina

Generale e negli ambulatori esterni. Tutta l'esperienza sviluppata in questi decenni per migliorare i rapporti con i clinici ospedalieri deve essere messa al servizio delle problematiche comunitarie: oltre alle informazioni sui criteri per la scelta delle indagini microbiologiche deve essere adottata anche una reportistica utilizzabile sia per l'approccio diagnostico sia per stimolare azioni di prevenzione e di sorveglianza.

Indispensabili sono gli incontri periodici per definire i criteri di appropriatezza, incontri che dovrebbero essere contemplati nei programmi di formazione obbligatoria

Nell'ambito della programmazione sanitaria, al fine di migliorare le potenzialità diagnostiche dei laboratori, deve essere previsto un sistema integrato, ospedale/territorio, in cui siano riconosciuti livelli diversi di prestazioni: impegno economico ed elevata tecnologia devono convogliare in Centri di riferimento, collegati via rete con le strutture e i servizi istituzionali.

Pertanto la riorganizzazione dei LMC deve comprendere i seguenti provvedimenti:

- sviluppo dei sistemi informativi;
- individuazione dei Laboratori di riferimento;
- standardizzazione delle procedure e definizione dei livelli di attività;
- istituzione di Gruppi di lavoro con specialisti ospedalieri, medici del territorio, epidemiologi per valutare i problemi che emergono di volta in volta e programmare gli interventi;
- sviluppo di piani di formazione ;

Il ruolo e la responsabilità dei LMC nella gestione delle infezioni nosocomiali e comunitarie rappresenta anche e soprattutto una nuova opportunità per accrescere le conoscenze: l'attività diagnostica tradizionale non è più sufficiente a supportare i compiti che ci vengono richiesti: è necessario sviluppare processi organizzativi rivolti anche alla sorveglianza e prevenzione sia in ambito ospedaliero che comunitario.



## S2.2

**ORGANIZZAZIONE E GESTIONE DELL'OSSERVATORIO OSPEDALIERO****Serra R.***U.O.A. Microbiologia, A.O. "S. Giovanni Battista", Torino*

Il laboratorio di microbiologia clinica (LMC) ha il compito istituzionale di identificare gli agenti eziologici delle infezioni, svolgendo così indirettamente un ruolo determinante nella sorveglianza e controllo delle patologie infettive. Inoltre esercita direttamente la funzione di osservatorio delle infezioni in ospedale (IO) attraverso le seguenti attività principali:

1. sorveglianza degli "alert organisms",
2. sorveglianza e controllo dell'emergenza,
3. sorveglianza delle chemioantibioticoresistenze.

In Piemonte, in base ai dati resi noti dall'Assessorato relativi al 2003, i sistemi di sorveglianza basati in prevalenza sui dati di laboratorio riferiti alle attività sopra indicate coinvolgono rispettivamente l'83%, il 69% e il 93% delle strutture sanitarie pubbliche. La reale efficacia di questi sistemi è tuttavia controversa, come risulta dai verbali della commissione regionale permanente che verifica, con cadenza annuale, i programmi e l'attività delle ASO/ASL piemontesi. I laboratori producono in genere una ingente quantità di reports che non sono sempre utilizzati per una efficace azione di prevenzione, ma che servono talvolta a mascherare carenze organizzative e inadempienze in altri settori della sorveglianza e controllo delle infezioni negli ospedali.

Si ritiene pertanto utile procedere ad una analisi degli aspetti organizzativi e gestionali del sistema di sorveglianza basato sui dati di laboratorio, al fine di individuarne le criticità e suggerire, sulla base dell'esperienza, eventuali azioni correttive.

**Il contesto organizzativo generale**

L'attività di LMC spesso non riesce ad integrarsi con il dispositivo di sorveglianza e controllo delle infezioni dell'ospedale. Le ragioni possono essere molteplici:

- scarsa attenzione al problema da parte delle direzioni sanitarie che si sentono coinvolte solo in occasioni, in realtà sempre più frequenti, di contenziosi che non di rado sfociano in procedimenti giudiziari: è sintomatico al riguardo che gli aspetti relativi alle IO siano spesso gestite dal responsabile del risk management;
- la Commissione per le Infezioni in Ospedale (CIO), struttura istituzionalmente deputata a tradurre in attività di controllo e prevenzione le indicazioni che derivano dalla sorveglianza, ha spesso funzione solo di rappresentanza, una composizione pletrica e si riunisce con frequenza troppo limitata per essere realmente incisiva;

- mancanza di interlocutori a livello di reparto dove i reports di LMC passano per lo più inosservati tra una miriade di circolari, disposizioni, comunicazioni di varia natura.

La riorganizzazione del dispositivo di sorveglianza e controllo delle IO dovrebbe comprendere i seguenti provvedimenti:

- istituzione di una struttura semplice (SS) o complessa (SC), a seconda delle dimensioni dell'ospedale, per la prevenzione delle IO, diretta da personale dotato di competenze specifiche (igienista, microbiologo clinico, infettivologo) e di una documentata esperienza nel settore;
- creazione di una task force (gruppo operativo o simile) costituita da microbiologo, infettivologo, infermiere addetto al controllo delle infezioni (ICI) e coordinata dal responsabile della SS/SC di cui sopra, che di fatto si occupi della gestione quotidiana dei problemi legati alle IO e si riunisca regolarmente con cadenza almeno settimanale o estemporaneamente in condizioni di emergenza, mentre al CIO sono demandate la stesura del programma annuale di sorveglianza e controllo delle IO;
- istituzione di una commissione antibiotici (vedi oltre);
- istituzione nei reparti di referenti per la sorveglianza e il controllo delle IO, individuati dal responsabile della SC, rispettivamente tra il personale dirigente e del comparto, sulla base di personali attitudini, esperienza e autorevolezza: tali referenti rappresentano i destinatari dei reports di LMC e i riferimenti con i quali quest'ultimo si confronta in occasione di riunioni programmate o in caso di emergenza.

Risulta infine di particolare efficacia individuare alcuni obiettivi, tra quelli della SC il cui raggiungimento comporta benefici economici per tutto il personale, legati alla sorveglianza delle IO. E' opportuno che gli obiettivi assegnati non siano, almeno inizialmente, troppo generici (es. riduzione delle IO in assoluto), ma più circoscritti, meglio se legati ad attività di formazione. Tali obiettivi devono essere quantificati e i risultati raggiunti verificati con indicatori misurabili.

**Sorveglianza e controllo dell'emergenza infettiva**

LMC non solo è chiamato a intervenire in condizioni di emergenza infettiva, ma ha un ruolo spesso determinante nella segnalazione tempestiva degli eventi epidemici. Il "case finding", ricerca sistematica di eventi a potenziale evoluzione epidemica, si avvale oggi, specie nei laboratori di maggiori dimensioni, di sistemi informativi che utilizzano software dedicati, ma che si basano in genere sulla rilevazione di variazioni della frequenza di isolamento di microorganismi ritenuti di particolare rilievo epidemiologico in quanto, tra le altre caratteristiche, potenziali agenti di eventi epidemici. Inoltre la ricognizione degli eventi epidemici è limitata alla popolazione a rischio costituita dai ricoverati o loro subset di singole aree dell'ospedale.

Ci sono evidenze tuttavia che la sensibilità di un sistema basato su tali criteri potrebbe essere messa in crisi in caso di eventi epidemici sostenuti da:

- microorganismi non compresi nell'elenco degli "alert organisms";
- più specie microbiche, evento frequente in condizioni di gravi carenze igienico-sanitarie, ad esempio infezioni delle vie urinarie associate a manovre di cateterizzazione vescicale non asettiche. In tal caso la sorveglianza basata sulla frequenza di isolamento del germe è insufficiente a rilevare un evento epidemico in cui è la frequenza dei casi di infezione a variare piuttosto che uno specifico agente eziologico.

Infine eventi epidemici possono interessare trasversalmente più aree dell'ospedale oppure ospedali diversi, per effetto della circolazione di pazienti infetti o colonizzati tra aree diverse dell'ospedale (tipicamente il percorso Pronto soccorso - rianimazione - degenza, con il coinvolgimento dei servizi diagnostici) o tra ospedali (da es., ospedale per acuti - RSA e/o viceversa).

Nella nostra esperienza la sorveglianza degli eventi epidemici dal LMC si dovrebbe basare oltre che su dispositivi automatici di case finding anche sulla consapevolezza di tutto il personale tecnico dei settori, la cui attenzione al problema permette di cogliere segnali deboli, o non rilevati routinariamente, di eventi anomali (es., incremento delle richieste di esami batteriologici o dell'isolamento di germi inconsueti). Altri aspetti organizzativi del LMC che permettono di far fronte in modo adeguato ad eventi epidemici, comprendono l'allestimento di una ceppoteca per lo stoccaggio sistematico dei ceppi di rilievo epidemiologico e la conservazione almeno delle colture più rappresentative (emocolture) per periodi di tempo adeguati (almeno 30 giorni), al fine di poter disporre, in caso di epidemia, di tutti gli isolati significativi.

Nell'ambito delle indagini rivolte a identificare la fonte dell'epidemia, campionamenti ambientali e ricerca di portatori rientrano tra i compiti spesso onerosi di LMC. Non occorre ricordare che tali indagini non devono mai essere indiscriminate, ma procedere da una accurata valutazione epidemiologica basata sulle caratteristiche dell'agente eziologico, sui risultati dei riscontri luogo-tempo-persona, sulle evidenze e letteratura, ecc.

E' innegabile tuttavia che LMC si debba preventivamente attrezzare per fronteggiare emergenze di questo tipo. Il campionamento di superfici, liquidi o aria comporta la disponibilità di attrezzature non abitualmente utilizzate nella diagnostica di routine: piastre da contatto, dispositivi di filtrazione, campionatori, ecc. Al di là dei protocolli operativi, spesso non standardizzati, l'interpretazione dei risultati dei campionamenti ambientali è resa problematica dalla mancanza o inaffidabilità di valori di riferimento. Inoltre, la ricerca di patogeni multiresistenti, può comportare l'allestimento

estemporaneo di terreni di coltura resi selettivi ad hoc mediante aggiunta di antibiotici e non disponibili in commercio. Infine le indagini culturali che si possono rendere indispensabili nel corso di un'epidemia possono comportare l'improvvisa necessità di ingenti quantitativi di terreni di coltura, non sempre a disposizione se LMC dipende da fornitori esterni. Occorre pertanto che, almeno i LMC di maggiori dimensioni, dispongano di mezzi autonomi per l'allestimento di terreni di coltura in condizioni di emergenza, specie se il contratto di fornitura prevede consegne rigidamente scadenze o si tratta di reagenti non facilmente reperibili in commercio.

Una accurata indagine epidemiologica non può prescindere oggi dalla tipizzazione dell'agente eziologico. Mentre le tecniche di tipizzazione fenotipica trovano un'applicazione sempre più limitata a motivo della loro scarsa sensibilità, la tipizzazione genomica, basata su metodiche biomolecolari, non solo si è affermata come "gold standard", ma si è differenziata in una miriade di tecniche che trovano indicazioni elettive in relazione alla specie da tipizzare.

Tali tecniche sono in genere complesse, richiedono attrezzature dedicate e notevole esperienza, non disponibili nella maggioranza dei laboratori. E' pertanto opportuna, anche se il problema assume connotazioni di carattere politico e organizzativo più generale su scala regionale e nazionale, la istituzione di centri di riferimento, organizzati in livelli a seconda della complessità delle tecniche analitiche. Se, da una parte, tale organizzazione costituisce una garanzia di qualità, il centro di riferimento rappresenta un osservatorio epidemiologico essenziale per monitorare la circolazione e le caratteristiche dei cloni epidemici su un territorio molto più esteso di un ambito meramente locale. Occorre tuttavia ricordare come, anche in uno scenario come quello prospettato, l'indagine epidemiologica locale sia insostituibile e preliminare all'invio di ceppi accuratamente selezionati al centro di riferimento per la tipizzazione.

#### **Sorveglianza delle antibioticoresistenze**

Il riconoscimento dei caratteri di resistenza richiede oggi una lettura interpretativa dei resistotipi e, in misura sempre maggiore, il ricorso a tecniche complesse di analisi genomica che richiedono anche in questo caso la disponibilità di centri di riferimento accessibili a tutti i laboratori periferici, per una adeguata e capillare sorveglianza delle resistenze.

Oggi quasi tutti i laboratori dispongono di sistemi informativi con software dedicati, più o meno sofisticati, per la elaborazione dei profili cumulativi di sensibilità/resistenza agli antibiotici degli isolati. Al fine di utilizzare i dati per scopi epidemiologici e renderli il più possibile omogenei per confronti intra - e inter-laboratori è necessario attenersi ad alcuni criteri generali:

- utilizzare come database preferibilmente ceppi "invasivi" isolati da campioni rappresentativi, al fine di minimizzare l'apporto di microorganismi

- espressione di colonizzazione piuttosto che di infezione;
- elaborare profili di sensibilità/resistenza disaggregati per materiale e area di provenienza; il numero minimo di ceppi significativo per ciascuna specie non deve essere inferiore a dieci e la frame temporale di 6-12 mesi;
  - per il controllo delle ridondanze attenersi ai riferimenti di letteratura disponibili, o in ogni caso utilizzare sempre il medesimo criterio per l'analisi di trend temporali interni all'ospedale;
  - indicare, nei reports destinati al CIO e alle SC, oltre alla frequenza relativa (percentuali di sensibilità/resistenza) anche la frequenza assoluta dei fenotipi di resistenza più significativi (MRSA, VRE, ESBL, ecc) in rapporto al numero dei ricoverati;
  - elaborare, in accordo con il clinico, e aggiornare periodicamente protocolli di terapia empirica delle infezioni più gravi o più frequenti, basati sulla frequenza di isolamento dei principali microorganismi e dei relativi profili di antibioticoresistenza;
  - saper interpretare con cautela i dati di sensibilità/resistenza in riferimento ai dati di consumo degli antibiotici: il rapporto tra il consumo di un antibiotico e selezione di resistenza è estremamente complesso per l'intervento di svariati fattori (pressione selettiva del farmaco, meccanismi di resistenza crociata, efficacia del controllo della trasmissione dei ceppi resistenti, ecc.).

Infine, il controllo dell'antibioticoresistenza a livello locale passa attraverso una efficace politica degli antibiotici che è la risultante degli sforzi congiunti di varie competenze all'interno dell'ospedale: direzione sanitaria, farmacisti, microbiologi, infettivologi, clinici, ICI: è pertanto auspicabile che il problema sia gestito da una apposita commissione che riunisca le figure professionali sopra elencate e che abbia i seguenti compiti istituzionali:

- sorveglianza dell'antibioticoresistenza,
- analisi dei consumi e delle motivazioni dell'uso degli antibiotici,
- elaborazione di linee guida di terapia empirica,
- aggiornamento del formulario degli antibiotici in ospedale,
- formazione.

In conclusione, le competenze di LMC in tema di sorveglianza delle IO sono molteplici e complesse, ma strategiche per la prevenzione. Le principali considerazioni che ne derivano sono le seguenti:

- il microbiologo deve dedicare oggi una parte sempre crescente del proprio lavoro al problema della sorveglianza e controllo delle IO, tenendo presente che l'attività diagnostica istituzionale non è più sufficiente da sola a supportare un'attività assistenziale sempre più orientata alla prevenzione. Compiti nuovi e vie più specializzati richiedono dotazione di risorse da parte delle direzioni genera-

li, ma soprattutto occorre, da parte dei vertici delle aziende sanitarie, la consapevolezza che LMC svolge all'interno dell'ospedale, un ruolo insostituibile anche di contenimento dei costi, concorrendo, attraverso il controllo delle infezioni ospedaliere, alla riduzione della durata della degenza;

- è infine sempre più necessario che il microbiologo "esca dal laboratorio", svolgendo la sua attività di consulenza alla stregua di altri specialisti e collaborando strettamente con questi, non solo per una più efficace gestione delle IO, ma anche per una più completa valorizzazione delle proprie competenze.

## S2.3

### L'OSSERVATORIO REGIONALE DEL PIEMONTE

**De Micheli V.**

*Assessorato Tutela Salute e Sanità del Piemonte*

I moderni metodi di lotta alle malattie infettive si basano su una serie di interventi complementari e coordinati che operano nel rispetto dei seguenti principi:

1. La messa in atto di una azione integrata tra educazione del pubblico, formazione degli operatori, organizzazione di campagne vaccinali e adozione di misure di igiene.
2. Il riconoscimento precoce delle patologie infettive con immediata segnalazione, seguita da notifica supportata da diagnosi clinica e confermata da diagnosi di laboratorio
3. Trattamento efficace e tempestivo delle infezioni
4. Adozione di sistemi di controllo speciali per specifiche patologie (come ad esempio la tubercolosi)
5. Studio immediato e interruzione della propagazione di eventi epidemici e di incidenti
6. Efficace comunicazione con il pubblico
7. Investimento di attività di ricerca e sviluppo sui metodi di controllo delle malattie infettive
8. Organizzazione di un forte sistema di sorveglianza, sostenuto da una adeguata rete diagnostica e con forti legami con gli altri sistemi di sorveglianza nazionali e internazionali.

Il laboratorio di microbiologia viene a giusto titolo coinvolto quasi in tutte le azioni sopra descritte e manifesta, al momento, una potenzialità informativa ancora incompletamente sfruttata a fini di sorveglianza.

Per promuovere la funzione di sorveglianza da parte dei laboratori di microbiologia occorre innanzitutto agire a livello culturale affinché i gruppi professionali coinvolti siano consapevoli e condividano gli scopi della sorveglianza epidemiologica; inoltre sarà necessario operare in modo che il ricorso alla conferma diagnostica di

laboratorio da parte dei clinici non avvengo in modo sporadico ma sia mirata, tempestiva e standardizzata.

Occorre infine intervenire a livello organizzativo per far sì che le funzione informativa si integri nell'organizzazione del lavoro di laboratorio senza costituire aggravio e senza interferire con le funzioni fondamentali di supporto alla diagnostica.

In Piemonte è in corso di realizzazione un progetto che si propone la creazione di una rete sperimentale di sorveglianza utilizzando i laboratori di microbiologia. Il sistema è stato pensato come un sistema sperimentale nazionale coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità con la partecipazione delle regioni.

## S2.4

### L'OSSERVATORIO REGIONALE DELL'EMILIA-ROMAGNA

**Moro M.L., Gagliotti C.**

Area Programma Rischio Infettivo,  
Agenzia Sanitaria Regionale, Emilia Romagna

#### Premessa.

I dati del laboratorio di microbiologia rappresentano una forma informativa insostituibile per descrivere l'epidemiologia delle infezioni in ospedale e in comunità. A partire dai dati di laboratorio è, infatti, possibile descrivere l'eziologia delle infezioni ospedaliere e la frequenza di resistenze agli antibiotici, ma anche assicurare la sorveglianza di patologie importanti nella comunità, quali la tubercolosi, le malattie invasive in età pediatrica, la legionellosi. Per questi motivi nella Regione Emilia Romagna è stato attivato un sistema di sorveglianza regionale basato sui dati di laboratorio, che inizialmente è stato orientato al fenomeno dell'antibioticoresistenza, ma che si propone di ampliare nel tempo i propri obiettivi a quelli sopra elencati.

#### Metodi.

Sono stati selezionati 17 laboratori con elevato volume di attività (esecuzione di almeno 500 emocolture per anno), identificati tramite una indagine conoscitiva effettuata nel 2001 (1). Nella fase iniziale sono stati trasferiti solo i dati di batteriologia (colture batteriche in generale ed esami microscopici per BK); in futuro la sorveglianza verrà estesa ad altri dati di microbiologia (sierologia, biologia molecolare ecc.). Le informazioni vengono estratte dai sistemi informatizzati dei laboratori in base ad un tracciato record predefinito che è costituito da tre sezioni: la prima include i riferimenti dei laboratori, i dati anagrafici dei pazienti e gli identificativi della scheda di dimissione per i ricoverati; la seconda i dati relativi a coltura ed identificazione dei batteri; la terza i risultati degli antibiogrammi (dati qualitativi ed, ove possibile, dati quantitativi). Per l'estrazione dei dati sono state utilizzate codifiche stan-

dard, definite con l'apporto di un gruppo nazionale (MICRONET) coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità. E' possibile il *linkage* tra i dati di laboratorio e gli altri flussi informativi esistenti a livello regionale. Il trasferimento dei dati è iniziato nel 2003. Per i primi due anni la cadenza di invio dei file è stata annuale; dal 2005 è divenuta semestrale. I dati relativi a ciascun invio sono stati inizialmente analizzati per valutarne la completezza; sono stati quindi utilizzati per la redazione di rapporti regionali che vengono pubblicati periodicamente (2-3).

#### Risultati.

La partecipazione dei laboratori è stata del 65% per il primo anno (11 laboratori su 17) ed è arrivata al 94% (16 laboratori su 17) nel primo semestre del 2005. La frequenza di microrganismi antibiotico-resistenti nella regione appare sostanzialmente sovrapponibile a quanto riportato a livello nazionale, ma significativamente più elevata rispetto ad altri paesi europei. In regione, infatti, appaiono più elevati i livelli di resistenza per tutti i microrganismi/materiali inclusi nello European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) rispetto a quelli osservati in altri paesi europei (EARSS Management Team, 2004, 2005); la prevalenza di antibioticoresistenza permane elevata anche per i microrganismi non considerati dall'EARSS. Particolarmente allarmanti risultano le proporzioni di:

- *S. pneumoniae* resistente a eritromicina;
- *S. aureus* resistente a meticillina e rifampicina;
- *E. faecium* resistente ad aminopenicilline e vancomicina;
- *K. pneumoniae* resistente a cefalosporine di III generazione;
- *P. aeruginosa* con resistenze singole o multiple agli antibiotici testati;
- *S. pyogenes* resistente a eritromicina.

Tra il 2003 e il 2004 è stato rilevato un aumento significativo della frequenza relativa di isolamenti di *Escherichia coli* da emocolture (<http://asr.regione.emilia-romagna.it/>).

Il *linkage* tra dati dei laboratori e consumo di antibiotici (dall'archivio della farmaceutica territoriale regionale) ha consentito di evidenziare l'associazione tra specifici profili di resistenza, quale *Streptococcus pyogenes* resistente a eritromicina e consumo di macrolidi (4) o *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina e consumo di chinolonici. L'archivio è stato anche utilizzato per evidenziare cluster ospedalieri di infezione, attraverso l'utilizzo di carte di controllo.

#### Conclusioni.

Il sistema rappresenta una solida base informativa sulla epidemiologia delle infezioni, sulla frequenza di antibioticoresistenza e sul suo andamento temporale, utile a formulare indicazioni terapeutiche, correlare il livello di resistenza all'uso di antibiotici e valutare l'efficacia di interventi per il contenimento/riduzione delle resistenze.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Moro ML, Gagliotti C, Morri M, Borri B.



- Fattibilità di un sistema di sorveglianza dell'antibioticoresistenza basato sui laboratori. Indagine conoscitiva in Emilia Romagna, Collana Dossier, n. 78, Regione Emilia-Romagna - ASR 2003
2. Gagliotti C, Moro ML. Sistema Regionale dell'Emilia-Romagna per la sorveglianza dell'antibioticoresistenza. Periodo 2001-2004. Regione Emilia-Romagna - Agenzia Sanitaria Regionale, 2005.
  3. Gagliotti C., Moro M.L. Sistema Regionale dell'Emilia-Romagna per la sorveglianza dell'antibioticoresistenza. Stato di avanzamento del progetto e confronto 2003-2004. Regione Emilia-Romagna - Agenzia Sanitaria Regionale, 2006
  4. Gagliotti C, Nobilio L, Milandri M, Moro ML for the Emilia-Romagna Antibiotic Resistance Study Group. Macrolide prescriptions and erythromycin resistance of *Streptococcus pyogenes*. Clin Infect Dis 2006; 42: 1153-6.

## S2.5

### L'OSSERVATORIO REGIONALE DELLA LOMBARDIA

**Viganò E.F.**

Laboratorio di Microbiologia, A.O. "O.C. Legnano",  
LEGNANO

Con il Decreto 8603 del 20/5/2002 che istituiva il Coordinamento Regionale dei Comitati di Controllo delle Infezioni Ospedaliere (CR-CIO), la Regione Lombardia ha avviato un processo di coinvolgimento diretto di Organizzazioni Sanitarie periferiche nella progettazione e nella gestione di interventi di sorveglianza e prevenzione (60 Strutture Sanitarie a maggio 2005).

Nel 2004 è stato avviato un progetto di Sorveglianza a partenza dalle Microbiologie, coordinato dal Dr. E.F. Viganò, che si è articolato in tre sottoprogetti:

- sentinella (SENTIOMB 1)
- resistenze antibiotiche (RESIOMB 1)
- batteriemie da *S.aureus* (BASALOMB 1)

Il CR-CIO ha deciso per l'avvio nel 2004 in fase sperimentale del progetto "sentinella", a cui hanno dato adesione 62 Strutture Sanitarie Pubbliche e Private della Lombardia.

Con la collaborazione dello Staff Sistemi Informativi e Organizzazione dell'Azienda Ospedaliera di Legnano è stato preparato un sito Internet, all'interno del sito dell'Azienda di Legnano, a cui avevano accesso riservato con ID e PSW le Microbiologie adenti al progetto, per inserire direttamente le segnalazioni.

Sono in corso adeguamenti dell'hardware e del software e per la fine del 2006 il progetto sarà esteso a tutte le Microbiologie della Lombardia.

Al 1 Giugno 2006 sono state accettate 12.000 schede

di segnalazione di sentinella. Viene presentata una analisi dei dati raccolti dal Settembre 2004 a Dicembre 2005, in termini di:

- tassi di sentinella (totali) per 1.000 ricoveri e per 10.000 gg. di degenza, stratificati su 4 categorie di Ospedali (per N. posti letto);
- mediana osservazione 21 sentinella, rispetto al ricovero
- tassi per singola sentinella per 1.000 ricoveri e per 10.000 gg. di degenza per la Regione e stratificati su 4 categorie di Ospedali ( per N. posti letto )
- tassi Regionali per MDR per 1.000 ricoveri e per 10.000 gg. di degenza
- tassi per singoli Ospedali per MDR per 1.000 ricoveri e per 10.000 gg. di degenza
- confronti tra diversi ospedali della stessa categoria
- distribuzione dei sentinella per mese di segnalazione e per classi di età dei pazienti

A Gennaio 2007 si avvieranno gli altri progetti (RESI-LOMB e BASALOMB).

## S2.6

### IL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E I MEDICI DI MEDICINA GENERALE

**Rossetti R.**

Delegato regionale AMCLI Toscana

In questi ultimi anni è cambiato notevolmente lo scenario in cui si trova ad operare il MMG perché si sono modificati drasticamente alcuni aspetti o comportamenti sanitari, tra i quali possiamo citare l'aumento dell'età media della popolazione, la tendenza ormai consolidata ad un maggiore ricovero dei soggetti anziani nelle strutture sanitarie protette e la precoce dimissione dei pazienti dai reparti ospedalieri per ridurre i costi della degenza e quindi la spesa sanitaria. Inoltre la diffusione in ampi strati della popolazione di alcune malattie infettive a trasmissione sessuale (infezioni da *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, sifilide) comporta un ruolo sempre più crescente ed attivo del MMG che si trova spesso in prima linea a fare una diagnosi eziologica precisa per instaurare una conseguente terapia antibiotica mirata.

Un altro problema riscontrato è quello della diffusione, anche in comunità, di batteri un tempo confinati in ambito nosocomiale, quali ad esempio *Staphylococcus aureus* meticillino resistente, enterobatteri produttori di  $\beta$ -lattamasi, enterococchi resistenti alla vancomicina; tutto questo impone un controllo epidemiologico sulla flora batterica isolata dai pazienti infetti per osservare eventuali aumenti di ceppi con resistenza allargata a molti antibiotici.

È quindi forzatamente cambiato anche l'approccio verso le malattie infettive del medico di medicina

generale il quale, sempre più spesso, si trova ad affrontare numerosi quadri clinici quali malattie respiratorie, genito-urinarie e gastroenteriche che richiedono talora anche un notevole impegno diagnostico e curativo.

In questo panorama è evidente l'importanza ed il ruolo che deve svolgere il Laboratorio di Microbiologia proponendosi come strumento indispensabile per il MMG ed operando al massimo per produrre risposte affidabili e rapide, necessarie per impostare una terapia destinata al successo.

Per procedere in questa auspicata direzione è tuttavia necessario che il Responsabile del Laboratorio di Microbiologia si proponga ai MMG direttamente o tramite i loro organismi di rappresentanza quali gli ordini professionali, le associazioni, le cooperative o le società scientifiche a livello provinciale, richiedendo un rapporto privilegiato e di stretta collaborazione e mostrando la sua disponibilità a discutere insieme le varie problematiche la cui risoluzione determina, come effetto diretto, un migliore approccio alla patologia infettiva del paziente e quindi ad una sua migliore cura.

Si tratta evidentemente di un percorso non facile ma che, con l'impegno attivo di entrambe le parti, può portare a concreti miglioramenti per la salute dei pazienti ed anche ad una riduzione delle spese sanitarie.

Tra le varie opportunità offerte da questa collaborazione possiamo includere gli indubbi vantaggi derivanti dal costante impiego delle corrette modalità di prelievo, conservazione e trasporto dei campioni biologici, la riduzione o la possibile eliminazione di alcuni esami obsoleti, inutili o ridondanti, l'introduzione di nuovi test diagnostici dimostratisi più affidabili per certe patologie infettive, la produzione di linee guida terapeutiche derivanti dallo studio dell'epidemiologia locale, la distribuzione dei referti per via informatica.

E' necessario quindi un impegno forte del Laboratorio di Microbiologia in questa direzione per riaffermare il suo ruolo insostituibile nella gestione delle infezioni anche in ambito comunitario e per proporre un ulteriore campo d'azione della sua attività in sanità pubblica.

# relazioni

## SESSIONE 3

### Infezioni urogenitali a eziologia batterica: diagnosi dell'infertilità su base infettiva

Martedì 19 Settembre 2006, ore 14.00 - 18.00, Sala 500

#### S3.2

#### NUOVE PROSPETTIVE DI GESTIONE DELLE PROSTATITI CRONICHE BATTERICHE. DALL'INQUADRAMENTO CLINICO ALLA GESTIONE TERAPEUTICA

**Magri V. °, Trinchieri A. ^, Perletti GP. \*, Restelli A., Garlaschi M.C., Torresani E. '**

*°Ambulatorio Territoriale di Urologia ed Ecografia Urologica - AO Istituti Clinici di Perfezionamento - Milano*

*^UO Urologia - AO Lecco*

*\*Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale*

*- Università degli Studi dell'Insubria*

*'UO Microbiologia - Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena - Milano*

Il Test di Meares e Stamey rappresenta il "gold standard" per la diagnosi delle infezioni genito-urinarie maschili.

Attualmente il nuovo schema classificativo delle prostatiti (NIH-1995) e la validazione dell'NIH Chronic Prostatitis Symptom Index (NIH-CPSI) hanno permesso un adeguato inquadramento di questo complicato processo infiammatorio, la cui prevalenza nella popolazione maschile del Nord-America oscilla tra il 2 e 16%. Questa difformità di prevalenza può essere attribuita alla mancanza di un unico e preciso criterio valutativo e alla non facile identificazione dei pazienti. Dal 2001 presso l'AO "ICP" è operativo un modulo interdisciplinare urologico-microbiologico in cui, pazienti selezionati con sospetta diagnosi clinica-ecografica di prostatite cronica, vengono sottoposti a specifici accertamenti microbiologici sull'eiaculato totale e su materiali biologici ottenuti con il tampone uretrale e il test di Stamey.

Gli accertamenti clinici-ecografici sono costituiti da:

- esame obiettivo generale - analisi sintomatologica strutturale - questionario NIH-CPSI e IIEF (compilati dal paziente) - esame obiettivo urologico - Ecografia pelvica per via sovrapubica e transrettale - Uroflussimetria (con RVPM ecografico) - PSA totale - Tampone uretrale - Test di Stamey e Meares modificato (VB1-VB2-EPS e/o VB3) - Eiaculato totale.

I microorganismi ricercati sono: - gram positivi e negativi (compreso il *Corynebacterium* seminale) - miceti - *Gardnerella* e *Trichomonas vaginalis* - *Mycoplasma hominis* - *Ureoplasma urealyticum* - *Chlamydia trachomatis* con metodica PCR.

Fondamentale per l'attribuzione di un ruolo patogeno ai microrganismi isolati è la valutazione della carica microbica (considerata patogena se uguale o > a 1000 UFC/ml) rilevata nei diversi campioni biologici. La positività colturale può essere considerata indicativa per la diagnosi di prostatite batterica solo se la carica microbica in EPS e/o VB3 o nel liquido seminale, è superiore di almeno un logaritmo alla carica delle urine raccolte con il mitto intermedio (VB2).

In una elevata percentuale di casi l'etiologia rimane ancora oggi sconosciuta. L'obiettivo futuro sarà quello di introdurre e sviluppare nuove metodiche al fine di indagare e chiarire il ruolo patogeno di microrganismi attualmente non ricercati o ritenuti non patogeni.

Nel nostro ambulatorio di ginecologia vengono studiate da un punto di vista microbiologico (tampone uretrale e vaginale, urine vescicali su mitto intermedio) anche le partners di maschi con prostatite cronica.

I nostri casi manifestano correlazioni interessanti, soprattutto per gli agenti frequentemente riscontrati (*Chlamydia*, *Streptococco* Beta Emol. Gr.B, *Ureoplasma*) e per la mancanza di studi precedenti.

Ipotizzando che una alterazione della normale composizione della flora batterica intestinale possa essere concausa di una prostatite (frequente associazione tra flogosi e dismicrobismo intestinale, tipologia dei microrganismi isolati), i pazienti affetti da tale patologia vengono inquadrati anche da un punto di vista internistico.

598 pazienti studiati (età media 43,2 anni, range 21-79), suddivisi con la classificazione NIH-NIDDK in:

- 204 pazienti con prostatite cronica batterica (34,2%)
- 346 pazienti con CPPS (57,8%)

- 48 pazienti con prostatite cronica asintomatica (8%).

Una valutazione comparativa tra analisi sintomatologica strutturale e NIH-CPSI, ha permesso di identificare le caratteristiche delle disfunzioni sessuali: deficit dell'eiaculazione (64,9%) deficit erettile (44,8%).

I disturbi della eiaculazione sono stati così suddivisi: bruciore e/o dolore durante o dopo l'eiaculazione (42,7%),

eiaculazione precoce (32,5%) ed emospermia (24,8%).

E' stata inoltre riscontrata una associazione tra prostatite cronica e varicocele (49,3 %).

I pazienti con PCB (esami microbiologici positivi in EPS e/o VB3, eiaculato totale) sono stati sottoposti a terapia medica associata (schema 3A): Antibiotica (ciprofloxacina e/o levofloxacina + azitromicina), Antiinfiammatoria (Permixon), Alfa-litica (alfuzosina). L'impiego del macrolide è giustificato dal fatto che esso sarebbe in grado di "alterare" i biofilm batterici aumentando la potenzialità antibatterica e antinfiammatoria del chinolonico.

La complessità diagnostica della prostatite cronica impone necessariamente un approccio multidisciplinare e una stretta correlazione tra le diverse figure professionali coinvolte (urologo-microbiologo-gastroenterologo-ginecologo-andrologo) al fine di una corretta valutazione e interpretazione dei risultati con l'obiettivo di impostare una appropriata terapia medica.

Questo perché di norma non è sufficiente trovare un microrganismo per individuare la causa dell'infezione; il problema reale è quello di interpretarne il significato patogeno e questo può farlo solo il clinico.

### S3.3

## RUOLO PATOGENETICO DEI MICRORGANISMI IMPLICATI NELL'INFERTILITÀ MASCHILE

**Terramocci R.**

*Laboratorio Analisi, Ospedale "Valduce", Como*

Secondo una definizione del WHO si definisce "Infertilità" la condizione per la quale una coppia sessualmente attiva che non utilizza metodi contraccettivi non riesce ad concepire figli durante un anno.

Circa il 25% delle coppie non riescono concepire e di queste circa il 15% richiede un trattamento per risolvere il problema.

L'uomo risulta coinvolto in circa il 50% delle volte e spesso le cause di infertilità sono presenti in entrambi i partner.

La causa infettiva di infertilità maschile è riscontrata

nel 6,6% dei casi, mentre idiopatiche anomalie del liquido seminale o cause non dimostrabili sono circa il 75%.

E' generalmente accettato che le infezioni genitali quali uretriti, epididimiti e prostatiti possano concorrere nel determinare infertilità anche se esistono ancora pareri discordanti circa l'esatto ruolo che queste rivestono nel determinare alterazioni significative dell'eiaculato.

Da una disamina della letteratura sull'argomento sono contrastanti le ipotesi circa il coinvolgimento della batteriospermia e della leucocitospermia nelle alterazioni del liquido seminale, anche se in alcuni lavori l'evidenza che batteri come Chlamydia e Mycoplasma giochino un ruolo importante è stato dimostrato.

In una metanalisi pubblicata nel 2002 venivano presi in considerazione 12 studi nei quali si evidenziava come il trattamento antibiotico ad ampio spettro utilizzando Doxiciclina, Eritromicina, Trimetoprim/Sulfametossazolo, Cefalexina e Ciprofloxacina in varie associazioni in pazienti che presentavano una leucocitospermia significativa, cioè superiore a 1.000.000 di GB/ml migliorava la qualità dell'eiaculato e diminuiva la concentrazione di granulociti neutrofili nello sperma.

Il fatto che in molti casi non sia dimostrabile una infezione batterica fa ipotizzare il ruolo anche dei virus o di protozoi nel determinismo di questi quadri infiammatori.

Comunque molti lavori riportano il ruolo diretto che possono esercitare i leucociti nella funzionalità degli spermatozoi.

Anche il volume dell'eiaculato è risultato favorevolmente influenzato dal trattamento antibiotico, facendo presupporre che infezioni che colpiscono prostata e/o vescicole seminali possano contribuire, riducendone l'elasticità, alla riduzione del suo volume.

Diversi criteri vengono presi in considerazione per dimostrare una infezione delle ghiandole accessorie maschili e come riportato in un lavoro di Comhaire (1980) sono:

- storia di infezione pregressa e/o una esplorazione rettale anormale
- alterazione nel numero di leucociti o batteri nel liquido di secrezione prostatica e/o in sedimento urinario dopo massaggio prostatico.
- crescita uniforme > 1000 UFC/ml di batteri patogeni o > 10.000 di batteri non patogeni nel liquido seminale diluito precedentemente 1:2
- carica > 1.000.000 UFC/ml di eiaculato non diluito
- una funzione disturbata della secrezione.

Due o più criteri potrebbero far pensare ad una infezione delle ghiandole accessorie maschili.

Appare molto importante, comunque, nel valutare una infezione degli annessi ghiandolari genitali maschili la qualità dell'esame microbiologico, solitamente eseguito sul liquido seminale.

La corretta applicazione delle indicazioni circa il pre-



lievo, le colture e l'interpretazione delle stesse forniscono i presupposti per un inquadramento, da punto di vista microbiologico, più esatto a supporto della diagnosi di infertilità nel maschio.

### S3.4

## RUOLO PATOGENETICO DEI MICROORGANISMI IMPLICATI NELL'INFERTILITÀ FEMMINILE

**Latino M.A.\*, Garlaschi M.C.\*\***

\* S.S.Dip. Batteriologia A.O. O.I.R.M. - Sant'Anna, Torino

\*\* Fondazione IRCCS Policlinico Mangiagalli e Regina Elena - Milano

Il WHO (World Health Organization) indica che le malattie sessualmente trasmesse sono la maggior causa mondiale di malattie acute, di infertilità, di malattie a lungo termine e morte. Gravi sono le conseguenze psicologiche per milioni di uomini, donne e bambini. Inoltre stima che insorgano 250 milioni di nuovi casi di Sifilide, Gonorrhoea, infezioni da Chlamydia e Trichomoniasi, nell'anno 1990, 333 milioni di nuovi casi nell'anno 1995, 340 milioni di nuovi casi nell'anno 1999.

Nello studio dell'infertilità la ricerca di eventuali Infezioni Sessualmente Trasmissibili (IST) rientra nel gruppo di indagini eseguite routinariamente. Tali infezioni possono, infatti, svolgere un ruolo sia nella patogenesi di quella che viene definita infertilità tubarica, sia di quella cervicale o uterina. I microrganismi più frequentemente chiamati in causa sono: *Chlamydia trachomatis* (C.t.), *Neisseria gonorrhoeae* (N.g.), Micoplasmi uro-genitali (*Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* e *Mycoplasma genitalium*). Questi microrganismi possono, infatti, dalla cervice uterina risalire verso l'apparato genitale alto e dar luogo ad una Malattia Infiammatoria Pelvica (MIP) con conseguente danno tubarico ed infertilità. La gravità del danno tubarico provocato è proporzionale alla probabilità di infertilità che può variare dal 3% circa in caso di danno tubarico lieve fino al 30% e oltre in caso di danno grave con occlusione tubarica. Tuttavia la maggior parte delle donne con infertilità tubarica (TFI) non riferisce una pregressa salpingite, a conferma del fatto che molte di queste infezioni decorrono in modo asintomatico, anche se la diagnosi microbiologica conferma un'infezione in atto o comunque pregressa.

Tra gli agenti eziologici menzionati C.t. risulta essere, soprattutto nei paesi occidentali, più strettamente associato a TIF rispetto a N.g. C.t., infatti può causare un'infezione cronica delle salpingi con persistenza anche dopo ripetuti cicli di terapia antibiotica. Molti lavori hanno evidenziato un'augmentata prevalenza di anticorpi anti C.t. in pazienti con infertilità tubarica

rispetto ai controlli. Elevati titoli di IgG anti-Chlamydia sono stati anche associati alla presenza di aderenze pelviche, idrosalpinge ed ad un aumentato rischio di GEU. E' ormai accertato che questi quadri clinici sono causati oltre che dall'azione patogena del microrganismo stesso, soprattutto dalla forte risposta del sistema immunitario dell'ospite, che nel caso di infezioni latenti o croniche, porta ad uno stato infiammatorio persistente con vero e proprio danno tissutale. Tuttavia non tutte le donne con un'infezione genitale da C.t. sviluppano una patologia tubarica. Solo un'infezione cronica, come avviene in seguito ad infezioni persistenti o ricorrenti, può indurre una reazione di ipersensibilità ritardata con conseguente danno tubarico. E' stato postulato che hsp 60 giochi un ruolo cruciale in questi processi in quanto una prolungata o ripetuta esposizione alla hsp 60, come accade durante una infezione da C. t., può portare alla produzione di anticorpi diretti sia verso la hsp 60 di *Chlamydia trachomatis* che verso quella di origine umana, provocando quindi una risposta di tipo autoimmune che, a sua volta giocherebbe un ruolo importante nella cronicizzazione dell'infezione. Un elevato titolo di anticorpi anti hsp umana e clamidiale è stato trovato sia nel siero sia a livello cervicale in donne con occlusione tubarica o con GEU.

Per quanto riguarda le infezioni da *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* i dati della letteratura indicano che questi microrganismi potrebbero essere implicati nelle infezioni pelviche anche se sembra che essi non giochino il ruolo principale, ma che il loro potere patogeno si esprima in presenza di altri agenti. Differenti lavori, ed in particolare quelli dell'equipe di Witkin hanno dimostrato un aumento significativo, e potenzialmente deleterio per i gameti, dei fattori dell'infiammazione (interleuchine, TNF, interferone ....) a livello della flora batterica vaginale delle donne infertili. Tuttavia, la maggior parte di queste pazienti presentavano anche un quadro di vaginosi batterica probabilmente vera causa del processo infiammatorio. Accertato sembra invece il ruolo di *Mycoplasma genitalium* nell'eziopatogenesi della MIP. Uno studio danese ha ancora dimostrato la presenza di anticorpi anti-M. genitalium nel 22% delle pazienti con infertilità tubarica vs il 6.3% del gruppo di controllo indicando questo microrganismo come possibile fattore di rischio indipendente di lesioni tubariche.

## S3.5

## PROPOSTE DI PROTOCOLLI DIAGNOSTICI E ORIENTAMENTI FUTURI

**Calì A. M.**

*Gruppo di Lavoro Infezioni Sessualmente Trasmesse - GLIST*

Soltanto 40-50 anni fa, l'infertilità non era un tema di rilievo. Poche erano le conoscenze scientifiche o mediche e il problema non era quasi mai discusso a livello sociale. I tempi sono cambiati e, negli ultimi 15-20 anni nelle società occidentali, il problema dell'infertilità è esploso sotto diversi aspetti: in primo luogo, ci sono più donne infertili nella popolazione, secondariamente una più ampia proporzione di coppie infertili ora richiede un trattamento. In risposta a questa aumentata domanda si sono sviluppati ed espansi i "centri/servizi per la fertilità" e le tecnologie per la procreazione medicalmente assistita (PMA). E' tempo, forse, di fare attente considerazioni per evitare di sfruttare la coppia infertile con test, procedure e trattamenti costosi e/o non necessari, ma anche di sottoporre a PMA pazienti valutati in modo incompleto. L'infertilità ha un'eziologia multifattoriale e come tale devono essere orientate diagnosi e terapia: quali dovrebbero essere attualmente le procedure diagnostiche per studiare una coppia infertile? A partire dagli anni '90, secondo le linee guida della American Fertility Society (1992) e della World Health Organization (1993), sono state raggruppate in 5 categorie: analisi del liquido seminale, valutazione dell'ovulazione, della morfologia dell'utero e delle tube, il post-coital test e la laparoscopia. Nel 1996, in occasione del workshop di Capri, l'ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) group concludeva che i test anormali che possono stabilire una correlazione con una fertilità compromessa sono: l'analisi del liquido seminale, l'isterosalpingografia (HSG) per la pervietà tubarica e la valutazione di laboratorio dell'ovulazione, ed eventualmente la laparoscopia per l'endometriosi e le aderenze. Linee guida più recenti (WHO, European Urology, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, ecc.) prevedono altri più complessi test funzionali ed è ormai documentata una marcata variabilità nei percorsi diagnostici, sia nell'uso dei test che della loro interpretazione, scelti spesso più per tradizione e preferenze personali che per dimostrata utilità.

Utilizzando i classici criteri per determinare l'utilità di un test diagnostico cerchiamo di capire il ruolo e i limiti del laboratorio di microbiologia e di individuare possibili protocolli per la diagnosi di infertilità su base infettiva. Sebbene la relazione tra infezioni sessual-

mente trasmesse/infezioni genitali e infertilità sia riconosciuta da più di un secolo la loro ricerca non rientra in modo uniforme nel gruppo di indagini eseguite dai vari centri. D'altra parte sappiamo che, molto frequentemente, un ampio spettro di microrganismi potenzialmente patogeni, in aggiunta a specie della flora fisiologica, sono presenti nel tratto genitale e possono essere identificati nello sperma, nel fluido vaginale e nelle secrezioni cervicali, sia da individui sani che da pazienti con alterazioni che riducono la fertilità; la percentuale di riscontri positivi è altamente condizionata dall'estensione dello screening, dalle condizioni di conservazione e trasporto del campione oltre che dall'applicazione di sensibili e specifici metodi diagnostici. Ed ancora quali sono i criteri interpretativi, quali riscontri riflettono una situazione patologica con esiti sulla fertilità? Nel "counselling" della coppia infertile le infezioni genitali devono essere analizzate secondo due gruppi nosologici: **infezioni come causa diretta di infertilità**, alterazioni organiche e/o funzionali a carico dell'apparato genitale, e **infezioni eventualmente concausa di infertilità**, muco cervicale ostile e cattiva interazione muco-seme. *U. urealyticum*, *M. hominis* e *genitalium* sono coinvolti nella patogenesi della MIP e nella compromissione della funzionalità tubarica, possono infettare la prostata, le vescicole seminali e l'epididimo, con dimostrata alterazione di numerosi parametri dello sperma. *Chlamydia trachomatis* è responsabile di lesioni tubariche maggiori e irreversibili; causa infezioni sintomatiche nel tratto genitale distale in circa il 50% degli uomini (uretriti anteriori), tuttavia il suo ruolo nel tratto genitale maschile prossimale è meno noto; in vitro l'incubazione degli spermatozoi con la C.T. causa declino del numero degli spermatozoi mobili e apoptosi. *Neisseria gonorrhoeae*: penetra nelle cellule secretorie dell'epitelio tubarico liberando fattori tossici; analoghe alterazioni cellulari, con conseguenti ostruzioni, determina nel tratto genitale maschile. *Trichomonas vaginalis nelle donne* è cofattore di PID, infertilità, negli uomini causa di uretrite non gonococcica, sterilità secondaria, in vitro determina alterazioni della motilità per il 50% degli spermatozoi e altera la qualità del seme aumentando la viscosità. *Candida albicans*, in donne immunocompromesse causa colpiti ed endometriti. Una flora vaginale anomala si associa localmente ad elevati tassi di IL-1 beta ed IL-8; tali citochine possono essere responsabili di alterazioni del muco cervicale, tossicità endometriale. Per adesione e/o agglutinazione alcuni microrganismi possono immobilizzare gli spermatozoi in funzione della concentrazione dei batteri nel liquido seminale; batteri adesi sulla superficie degli spermatozoi danneggiano l'interazione spermatoocita. Quale diagnosi? Sulla base dei dati clinico-anamnestici vanno indagate tutte le infezioni acute e croniche dell'apparato genito-urinario di entrambi i partners secondo procedure definite e standardizzate. Quali evidenze supportano l'esecuzione d'indagini

microbiologiche in pazienti asintomatici? Le alterazioni dei parametri seminologici costituiscono il primo e forse unico segno di flogosi dell'apparato genitale maschile nelle forme clinicamente silenti: esame del liquido seminale e spermiocoltura, secondo le linee guida interpretative della WHO. La ricerca di Chlamydia è sempre richiesta in entrambi i partners, ma la negatività non esclude la sua presenza allo stato latente: metodiche NAAT su prelievi cervicali (donna) e uretrali (uomo), su urine di primo getto (uomo e donna), problematica su liquido seminale. In caso d'indagine su coppie infertili diversi autori concordano nel consigliare:

- a. Screening per le IgG sieriche usando un test specie-specifico;
- b. Dosaggio delle IgA secretorie nel muco cervicale o nel liquido seminale;
- c. Se uno dei due precedenti test risulta positivo si dovrebbe eseguire il dosaggio delle IgG sieriche anti hsp 60.

Il test più comunemente usato è la microimmunofluorescenza (MIF) considerato a tutt'oggi il "gold standard" anche se ha diverse limitazioni; ma sono anche disponibili l'immunoperossidasi indiretta (IPA) tecniche ELISA, Western Blot.

# relazioni

## SESSIONE 4

### Le infezioni virali del tratto genito-urinario

Mercoledì 20 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, Sala 500

#### S4.2

#### RUOLO DEL PATOLOGO NELLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA HPV

##### Quarto F.

*Struttura complessa di Anatomia ed Istologia patologica e Citopatologia A.S.L. Na-5,  
presidio ospedaliero San Leonardo;  
Viale Europa Castellammare di Stabia (NA)*

Come già detto in altre occasioni, ove vi fosse bisogno di un esempio per indicare l'evoluzione e la tras migrazione della Anatomia ed Istologia patologica dell'ultimo trentennio, il capitolo della citologia della cervice uterina sarebbe, a buon ragione, il primo ed il più ricco di spunti.

Grazie anche allo studio di tale patologia, il morfologo puro ha mutato e sta mutando l'approccio alla diagnostica routinaria delle patologie neoplastiche e si è trasformato ripescando quella quota culturale di patologo generale che per un periodo era andata un po' dimenticata.

Lo studio sistematico delle alterazioni citologiche dell'area giunzionale della portio, che portano all'evento cancro, iniziato a metà del secolo scorso, ha permesso l'individuazione di un modello di trasformazione che poi è risultato essere del tutto coerente con le attuali conoscenze sulla evolutività temporo/morfo/molecolare delle lesioni epiteliali da quelle preneoplastiche (SIL, CIN, discariosi) a quelle neoplastiche maligne (carcinomi).

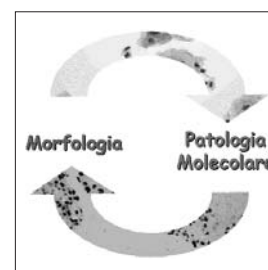
Alla fine la morfologia delle lesioni (fenotipo) da quelle di basso grado (L-SIL) a quelle di alto grado (H-SIL) ed alle infiltranti (Carcinoma), ben sposa con il concetto che i carcinomi sono di fatto l'epifenomeno di modificazioni geniche (mutazioni) in cui sono coinvolte diverse classi di geni (genotipo) in maniera per lo più metacrona.

Ancora, l'individuazione di modificazioni morfologiche legate ad infezione da HPV (coilocitosi ed altre minori), concomitanti con quelle discariotiche (L e H-SIL), ha dato la stura ad una serie di studi a seguito dei quali oggi possiamo certamente affermare che l'infezione da HPV dell'area giunzionale della cervice uterina, soprattutto se sostenuta da alcuni ceppi, è evento importante e necessario nel processo di carcinogenesi di tale tratto anatomico.

Le donne con infezione cervicale da HPV hanno dimostrato 100 volte più probabilità di sviluppare carcinoma cervicale rispetto ad una popolazione normale, ma solo poche donne con infezione da HPV HR sviluppano la malattia neoplastica intesa come fenotipo infiltrante (carcinoma).

L'introduzione della cosiddetta citologia in fase liquida ha, nell'ultimo decennio, dato infine l'ultima spallata al morfologo puro consentendo di fatto sullo stesso prelievo di eseguire anche ricerche molecolari che permettono l'individuazione del ceppo infettante e consentono anche l'identificazione del profilo trascrizionale delle sequenze virali, permettendo l'individuazione e la selezione dei casi ad effettivo rischio di insorgenza di cervicocarcinoma.

In definitiva, la combinazione fra una buona diagnosi morfologica, l'identificazione e tipizzazione del DNA degli HPV-HR e la valutazione del profilo trascrizionale delle oncoproteine virali E6/E7 comporta un sostanziale aumento della sensibilità diagnostica ed una migliore gestione e follow up del paziente ed ha trasformato il patologo puro in un patologo funzionale morfomolecolare.





### S4.3

## DIAGNOSI MOLECOLARE DELLE INFEZIONI GENITALI DA PAPILOMAVIRUS (HPV)

**Cattani P.**

*Istituto di Microbiologia, Dipartimento di Diagnostica Morfologica, Microbiologica, Molecolare e delle Malattie del Sangue, Università Cattolica, Roma*

Tra i virus trasmessi per via sessuale i Papillomavirus umani (HPV) occupano un posto importante sia per l'elevata frequenza delle infezioni nella popolazione generale che per la significativa associazione con la patologia neoplastica cervicale.

La persistenza dell'infezione da HPV viene indicata come uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di carcinoma della cervice uterina. In particolare, l'attività oncogena espressa dalle due proteine virali E6 ed E7 è molto più efficiente in alcuni genotipi di HPV che per questo sono stati classificati "ad alto rischio" per l'associazione con quelle anomalie cellulari che presentano una variabile potenzialità di evoluzione verso il carcinoma invasivo.

La diagnosi di laboratorio delle infezioni da HPV utilizza esclusivamente metodiche molecolari per la ricerca e l'eventuale genotipizzazione di acidi nucleici virali nel materiale biologico proveniente dalla sede della lesione.

I quesiti diagnostici principali che il laboratorio di virologia clinica deve contribuire a chiarire riguardano essenzialmente l'identificazione di un'infezione attiva, la dimostrazione di una persistenza dell'infezione, in particolare da genotipi "ad alto rischio", e l'individuazione dell'attività oncogena associata all'espressione genica virale.

La valutazione del risultato di un test diagnostico per la ricerca del genoma virale deve tener conto del fatto che, sebbene la presenza di DNA di HPV "ad alto rischio" sia generalmente associata ad un aumento del rischio di trasformazione cellulare indotta da HPV, la maggior parte di queste infezioni è naturalmente transitoria e non significativa dal punto di vista clinico e solo in una piccola percentuale di casi la lesione evolve lentamente verso un carcinoma della cervice. Inoltre, per stabilire la persistenza dell'infezione è necessario poter escludere la frequente possibilità di una nuova infezione.

Alla luce di queste considerazioni verranno presentate le più recenti metodiche disponibili per la ricerca di HPV sia come determinazione qualitativa sia come genotipizzazione, valutando vantaggi e svantaggi dei diversi approcci diagnostici ed il loro significato dal punto di vista clinico.

Più recentemente, l'applicazione di metodiche moleco-

lari per la determinazione quantitativa degli acidi nucleici ha offerto alla diagnostica degli HPV nuovi strumenti, valutabili nell'ottica di una valutazione prognostica dell'infezione da Papillomavirus. Verrà quindi discusso il significato e il valore delle più recenti metodiche quali la determinazione quantitativa del DNA di Papillomavirus, mediante Real-time PCR, e dell'RNA espressione degli oncogeni virali E6 ed E7 mediante Real-time RT-PCR. La ricerca dei trascritti E6 ed E7, associata alla determinazione del DNA virale, sembra significativa per l'identificazione di un'infezione persistente nella quale la perdita della normale regolazione dell'espressione genica virale indica una probabile progressione della lesione.

La determinazione di mRNA virali, così come la ricerca di altri marcatori, virali e/o cellulari, dell'attività del virus e del suo potenziale oncogeno, costituiscono i principali obiettivi verso i quali è indirizzata la ricerca molecolare applicata alla diagnostica di laboratorio delle infezioni da Papillomavirus.

### S4.4

## MARKERS MOLECOLARI NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HPV GENITALI

**Zerbini M.**

*Sez. Microbiologia, Dip. Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Univ. di Bologna*

In questi ultimi anni l'utilizzo di test molecolari per la ricerca di HPV ad alto rischio oncogeno ha trovato ampia diffusione come strumento diagnostico fondamentale per l'implementazione dell'esame citologico nella prevenzione del carcinoma del collo dell'utero e nel follow up di pazienti trattate per lesioni di alto grado.

Infatti, dagli studi epidemiologici emerge che la persistenza d'infezioni da HPV ad alto rischio oncogeno precede e predice lo sviluppo in senso maligno delle lesioni squamose intraepiteliali. Inoltre altri fattori quali: un'alta carica di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno nei campioni cervicali, lo stato fisico integrato del DNA virale nel genoma cellulare e l'espressione degli oncogeni E6/E7 sembrano avere un valore diagnostico e prognostico.

Studi epidemiologici sono stati compiuti, in gran parte, mediante saggi di ibridazione con amplificazione del segnale chemiluminescente (Hybrid Capture, Digene) e saggi molecolari, che si basano sull'amplificazione di diverse sequenze geniche di HPV e successiva tipizzazione genotipica mediante enzimi di restrizione o saggi di ibridazione con sonde tipo-specifiche. Più recentemente sono stati utilizzati inoltre saggi quantitativi di real-time PCR per la ricerca, la tipizzazione e

la quantificazione del DNA virale e degli mRNA.

Nel laboratorio diagnostico i saggi di PCR impiegati utilizzano prevalentemente coppie di primer "di consenso" che consentono l'amplificazione di sequenze genomiche di molteplici genotipi di HPV. La maggior parte dei primer di consenso utilizzati nella diagnosi di infezione da HPV sono localizzati nelle regioni L1 ed E6/E7 del genoma degli HPV, essendo entrambe le regioni altamente conservate. I prodotti di PCR ottenuti con i primer di consenso vengono poi generalmente ibridati con sonde oligonucleotidiche tipospecifiche che oltre ad aumentare la sensibilità del metodo sono in grado di definire il genotipo virale.

Lo sviluppo di tecniche di PCR real-time quantitativa ha consentito di ampliare considerevolmente la rilevanza diagnostica della presenza di acidi nucleici virali in un campione clinico, una genotipizzazione è possibile sia utilizzando primer specifici sia sonde genotipo-specifiche. Una PCR real-time quantitativa è in grado di fornire informazioni sulla presenza e tipizzazione del DNA virale e sulla carica virale. Inoltre mediante analisi quantitativa del rapporto numerico tra i geni E2/E6 è possibile determinare lo stato fisico del DNA di HPV, differenziando lo stato episomale rispetto allo stato integrato, indicativo di progressione neoplastica della lesione. L'analisi dei trascritti di E6/E7 si è rivelata inoltre uno strumento utile per definire la persistenza e l'espressione delle infezioni da HPV ad alto rischio e quindi per identificare pazienti a rischio di progressione di malattia.

Concludendo quindi abbiamo a disposizione tecniche molecolari raffinate che ci permettono di diagnosticare non solo la presenza di HPV ad alto rischio oncogeno nel campione in esame, ma mediante lo studio della carica virale, dello stato fisico e dell'espressione dei mRNA ci possono fornire informazioni sulla possibile evoluzione della malattia.

## S4.5

### INFEZIONI DEL VIRUS BK NEL TRATTO URINARIO

**Corallini A.**

*Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università degli Studi, Ferrara*

Il virus BK (VBK), un papovavirus umano, è stato isolato per la prima volta nel 1971 da un paziente che aveva sviluppato una stenosi dell'uretere dopo un trapianto renale.

In seguito altri isolamenti del virus sono stati fatti da individui immunosoppressi a seguito di un trapianto renale o di midollo osseo. Indagini sierologiche hanno dimostrato che il virus è distribuito in tutto il mondo e la prima infezione si manifesta già nella prima età: a

tre anni il 50% dei bambini ha anticorpi contro il VBK e la percentuale di individui positivi raggiunge il 90% negli adulti. L'infezione primaria è di solito asintomatica e solo occasionalmente può essere accompagnata da una moderata infezione delle vie respiratorie o del tratto urinario. Durante l'infezione primaria si manifesta una viremia e il virus si diffonde in diversi organi, dove rimane in uno stadio di latenza.

Studi clinici, realizzati in individui immunosoppressi e immunocompetenti, indicano che la riattivazione di VBK dalla latenza è associata soprattutto con un stato di immunodeficienza immunologica. Con diverse tecniche di analisi è stato osservato che il rene rappresenta il principale sito di latenza del virus in individui sani, anche se sequenze virali sono state trovate in altri organi, quali il fegato, lo stomaco, i polmoni e i linfonodi. Poco è conosciuto circa la modalità di trasmissione del virus e di accesso ai tessuti, anche se l'infezione delle prime vie respiratorie durante il primo contatto con il virus e la presenza di DNA virale nelle tonsille indicano che la via di trasmissione più probabile possa essere quella orale.

La riattivazione di VBK è stata osservata nelle urine di individui immunosoppressi a seguito di un trapianto di rene o di midollo osseo, nelle urine di donne gravide e in pazienti con immunodeficienza ereditaria o acquisita. Tale riattivazione può indurre manifestazioni infiammatorie, che colpiscono diversi organi. In particolare è stato osservato che trapiantati renali hanno manifestato una nefrite (2,5%), una occlusione dell'uretere (72%) e in alcuni casi il rigetto dell'organo. Inoltre è stata descritta un'associazione fra cistite emorragica e VBK in pazienti che hanno ricevuto il trapianto del midollo osseo. Così pure diversi ricercatori hanno descritto gravi disfunzioni in pazienti che, a seguito di un trapianto renale, hanno manifestato una necrosi dei tubuli renali a causa di una ampia replicazione di VBK nell'epitelio degli stessi tubuli.

## S4.6

### INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS: IMPLICAZIONI CLINICO-DIAGNOSTICHE

**Lazzarotto T., Landini M.P.**

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

Il Citomegalovirus umano (CMV) è un *Betaherpesvirus* responsabile di infezioni endemiche ed ubiquitarie. Nel corso dell'esistenza dal 40 all'80% degli individui nei Paesi industrializzati e la quasi totalità degli individui nei Paesi in via di sviluppo, va incontro ad infezione da CMV.

L'infezione è così diffusa perché la propagazione del virus è favorita dalla sua eliminazione che può prolungarsi per periodi molto lunghi e dal fatto che la maggior parte delle infezioni decorre in modo asintomatico o paucisintomatico, compatibile, quindi, con una normale vita di relazione del soggetto infetto.

L'analisi istopatologica del materiale autoptico da pazienti con infezione da CMV ha dimostrato che virtualmente ogni organo può essere infettato da questo virus. Inoltre, la ricerca del virus in coltura ha dimostrato che durante un'infezione acuta tutti i tipi di secrezione possono contenere il virus. Sembra, quindi, che CMV sia riuscito ad acquisire nel corso dell'evoluzione una capacità non comune di interagire in modo molto eclettico con il suo ospite naturale.

Le caratteristiche più importanti del tropismo di CMV sono:

- 1) la capacità di infettare e replicarsi in cellule distribuite ubiquitariamente come le cellule epiteliali ed endoteliali che occupano una posizione strategica per la disseminazione e la diffusione del virus;
- 2) la capacità di infettare e replicarsi in cellule del tessuto connettivo ubiquitariamente distribuite nello stroma di vari organi, come i fibroblasti;
- 3) la capacità di infettare i leucociti del sangue periferico;
- 4) la capacità di infettare e replicarsi in vari tipi di cellule parenchimali specializzate come i neuroni, le cellule muscolari lisce e gli epatociti, a volte causando un consistente effetto citopatico.

Contrariamente a ciò che si osserva *in vitro* in cui la replicazione di CMV nelle cellule epiteliali è scarsa o completamente assente, durante l'infezione *in vivo* queste cellule sembrano molto suscettibili all'infezione e sono di notevole importanza strategica. Infatti, poiché gli strati epiteliali del tratto respiratorio, del tratto gastrointestinale e genito-urinario formano l'interfaccia tra l'organismo infettato e l'ambiente esterno, essi sono siti importanti sia per l'ingresso del virus nell'ospite che per l'eliminazione del virus attraverso le secrezioni corporee. L'eliminazione del virus avviene nel lume del rispettivo organo sia sotto forma di virus libero perché rilasciato dalle cellule epiteliali infettate, sia sotto forma di cellule epiteliali infettate visto che l'infezione ne favorisce il distacco.

Il rene rappresenta uno dei siti più frequenti di infezione da CMV. Nel rene, il virus può infettare sia l'epitelio glomerulare che tubulare. Le cellule giganti sono caratteristicamente associate ad un infiltrato cellulare interstiziale. Agglomerati imponenti di cellule giganti possono riempire i tubuli prossimali vicino alle aree corticali. Possono essere anche presenti nell'ansa di Henle e nel tubulo collettore e, più raramente, nei glomeruli. L'infezione si accompagna ad una fase di viruria persistente che però di norma, non disturba la funzionalità renale.

# relazioni

## SESSIONE 5

### La diagnostica molecolare in batteriologia: attualità e prospettive

Mercoledì 20 Settembre 2006, ore 09.00-13.00, Sala GIALLA

#### S5.1

#### L'EVOLUZIONE DELLA BATTERIOLOGIA ALLA LUCE DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE

**Cassone A.**

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La diagnostica microbiologica continua a costituire, insieme allo sviluppo diagnostico in altri settori (vedi oncoproteomica) la vera rivoluzione nelle malattie infettive, in alto contrasto con la scarsità di nuovi antibiotici e approcci terapeutici e le usuali difficoltà e lentezze nella generazione ed uso di nuovi vaccini.

Le prospettive sono chiare: una diagnosi comprensiva di vari agenti microbici su sistemi miniaturizzati e di facile esecuzione e lettura nel laboratorio se non a letto del paziente.

Questa prospettiva non data fra 20 o 30 anni bensì fra 3 - 5 anni: rimangono insoluti e richiedono attenta considerazione i problemi di validazione dei diversi arrays genomici e proteomici nonché la sempre difficile integrazione fra i dati di laboratorio e l'esperienza clinica.

#### S5.2

#### IDENTIFICAZIONE RAPIDA DI AGENTI DI BIOTERRORISMO IN SITUAZIONI DI EMERGENZA

**Carattoli A.**

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immuno-Mediate, Istituto Superiore di Sanità-Roma

In accordo con le linee guida internazionali (Centers

for Disease Control and Prevention, CDC) e nazionali (Istituto Superiore di Sanità, ISS), la diagnosi microbiologica di patogeni batterici di classe A potenzialmente utilizzati a scopo bioterroristico è organizzata in livelli progressivi di accertamento e conferma. Nel caso di sospetto isolamento di patogeni tipo *Bacillus anthracis* o *Yersinia pestis*, i ceppi vengono analizzati per la conferma definitiva da un laboratorio di riferimento nazionale. Durante l'attacco bioterroristico negli USA, in Italia sono state elaborate linee guida per il potenziamento diagnostico di agenti patogeni potenzialmente utilizzabili a scopo bioterroristico ed è stata creata una rete di laboratori di riferimento in grado di fornire una diagnosi definitiva ed eventualmente una tipizzazione molecolare dei ceppi isolati. In questo ambito, il gruppo di lavoro sul bioterrorismo ISS ha messo a punto metodi molecolari basati sull'amplificazione per PCR ed ibridazione con sonde specifiche (Real-time PCR) per il riconoscimento e la caratterizzazione di *B. anthracis* e *Y. pestis*. In particolare, è stato messo a punto un protocollo diagnostico basato sulla rilevazione diretta di spore di *B. anthracis* nei tamponi nasali, mediante arricchimento in brodo, sterilizzazione in autoclave e rilevazione di geni specifici per Real-time PCR. Sono state disegnate coppie di primer utili all'identificazione definitiva di *B. anthracis* e *Y. pestis*. Altri primers sono utilizzati per discriminare il ceppo Sterne (ceppo vaccinale veterinario) dai ceppi selvatici isolati in Italia e dal ceppo Florida isolato negli USA dal primo caso di antrace polmonare nel 2001. Sono anche disponibili sonde che distinguono il *B. anthracis* da altre specie del genere *Bacillus*, compreso il *B. cereus* e amplificazioni specifiche per il riconoscimento rapido di *Yersinia* di altre specie più comuni dalla *Y. pestis*.

Per la tipizzazione dei ceppi sono state messe a punto tecniche innovative di rilevazione di loci polimorfici nel genoma di *B. anthracis* e di *Y. pestis*. Questo tipo di analisi è utilizzabile in caso di attacco bioterroristico come indagine per la ricerca della sorgente e per la comparazione di ceppi isolati dai vari casi clinici e dal-



l'ambiente ma anche in casi di trasmissione animale-uomo per una rapida indagine epidemiologica.

## S5.4

### TECNICHE MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE RAPIDA DI INFEZIONI DA MICRORGANISMI MULTI-RESISTENTI IN PAZIENTI CRITICI

**Stefani S.**

Dipartimento di Scienze Microbiologiche  
Università degli Studi di Catania  
Email [stefanis@unicat.it](mailto:stefanis@unicat.it)

L'identificazione rapida e specifica di batteri patogeni, nel trattamento di pazienti critici, rappresenta spesso l'evento cruciale nella diagnosi e nell'esito di infezioni gravi, principalmente nei reparti a rischio. Le metodiche microbiologiche tradizionali stanno gradatamente lasciando il passo all'avvento delle tecniche molecolari, grazie alla loro maggiore sensibilità e specificità e alla rapida capacità di predizione.

Gli strumenti della biologia molecolare sfidano i test diagnostici più avanzati: sono a disposizione parecchi tests commerciali e non, basati sulle tecniche della PCR (amplificazione genica di specifici geni target e loci universali come il gene della 16S rRNA), dell'ibridazione genica (polimorfismi di regioni geniche altamente conservate come i geni housekeeping) e dell'ibridazione normale ed *in situ* (FISH) che consentono lo screening di un'ampia varietà di fattori genetici direttamente dal materiale patologico, aumentando non solo la sensibilità, ma riducendo drasticamente il tempo necessario per l'identificazione dei patogeni e i loro quadri di resistenza. Inoltre, tecnologie avanzate come la PCR-Real Time, il sequenziamento genico e i microarrays stanno creando nuove opportunità di sviluppo nel campo della microbiologia molecolare.

Comparate con le normali tecniche fenotipiche tradizionali, le nuove tecnologie molecolari, basate sull'analisi del DNA, hanno i seguenti vantaggi:

- i) individuazione diretta e rapida identificazione di microrganismi che crescono lentamente o di germi particolarmente esigenti, difficili da coltivare *in vitro*;
- ii) possibilità di intraprendere studi epidemiologici, attraverso tecniche di:
  - i) typing molecolare, mediante l'analisi dei polimorfismi dell'intero genoma o di specifiche regioni geniche (PFGE, RAPD, AFLP);
  - ii) caratterizzazione mediante metodologie basate sulla sequenza degli acidi nucleici (MLST);
  - iii) identificazione di markers genici di resistenza per specifiche classi di antibiotici.

L'interpretazione del risultato di tests diagnostici molecolari, così come per i tests immunologici, deve essere criticamente valutato in relazione alla situazione clinica del paziente.

## S5.5

### IDENTIFICAZIONE DI BATTERI MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENICO

**Visca P.**

Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tre e  
Istituto Nazionale di Malattie Infettive IRCCS  
"Lazzaro Spallanzani", Roma

L'identificazione rapida e certa di un agente infettivo è l'obiettivo principe della diagnostica microbiologica ed ha ricadute dirette sulla qualità della gestione clinica dei pazienti. L'introduzione delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici nella routine microbiologica ha contribuito in misura considerevole al raggiungimento di tale obiettivo. La parallela evoluzione tecnologica, le semplificazioni metodologiche, l'abbattimento dei costi di esercizio e la creazione di risorse informatiche in rete hanno reso accessibili le procedure di identificazione e tipizzazione su base genetica ad una sempre più vasta utenza. I metodi convenzionali, culturali e biochimici, possono fallire nell'identificare microrganismi con caratteristiche fenotipiche inusuali e non possono essere applicati a microrganismi difficilmente coltivabili o non coltivabili. La potenza diagnostica delle tecniche di sequenziamento si basa su dei solidi fondamenti di genetica evolutiva applicabili a tutti i taxa, garantendo in tal modo la precisa allocazione tassonomica di qualsivoglia microrganismo, sia esso un eubatterio, un archea o un micete. In questa presentazione sarà illustrato l'utilizzo di tecniche di sequenziamento genico in microbiologia diagnostica. Saranno descritti i principi guida nell'identificazione microbica mediante tecniche di sequenziamento dei geni codificanti gli RNA ribosomiali (rDNA *sequence-based identification*), il percorso analitico di base e l'evoluzione della metodica come conseguenza del miglioramento tecnologico (Kolbert & Persing, 1999, Curr. Opin. Microbiol., 2:299; <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Saranno commentati dei casi clinici esemplari il cui successo diagnostico è dipeso dall'applicazione di tali tecniche. Una fine allocazione tassonomica dei microrganismi patogeni gioca un ruolo critico anche nell'epidemiologia delle malattie infettive, garantendo la tracciabilità di cloni al fine di un loro controllo. Le grande maggioranza delle tecniche di epidemiologia molecolare si basa sull'analisi della migrazione elettroforetica di frammenti di DNA generati da macrorestrizione di genomi o da

amplificazione di definite regioni di questi. Negli ultimi 5 anni è stata ideata ed applicata ad un vasto repertorio di specie batteriche una nuova tecnica di tipizzazione basata sul sequenziamento di alcuni geni vegetativi (*MultiLocus Sequence Typing*, MLST; Urwin & Maiden, 2003, *Trends Microbiol.*, 11:479; <http://pubmlst.org/>). La variabilità allelica in tali geni consente di definire un ceppo batterico attraverso un codice numerico unico. La tecnica è dotata di potere discriminatorio e riproducibilità elevati, essendo basata su dati di sequenza piuttosto che su dimensioni di frammenti di DNA. Questa caratteristica rende la tecnica assolutamente svincolata dalla piattaforma analitica (sequenziatore). La MLST trae vantaggio dalla combinazione di tecnologie di sequenziamento avanzate e di approcci bioinformatici per lo studio della genetica di popolazioni, offrendosi come uno strumento universale nello studio della struttura di popolazioni. Ad oggi sono stati sviluppati schemi MLST molti microrganismi d'interesse clinico, ed i dati generati hanno contribuito in maniera sostanziale alla sorveglianza epidemiologica di importanti microrganismi patogeni.

# relazioni

## SESSIONE 6

### MRSA: da patogeno ospedaliero a patogeno comunitario

Mercoledì 20 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, Sala BERLINO

#### S6.1

#### STORIA ED EVOLUZIONE DI MRSA

**Varaldo P.E.**

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

Nessuna specie batterica è mai stata segnata da un'antibiotico-resistenza quanto lo *Staphylococcus aureus* dalla meticillino-resistenza. Quella di MRSA (*methicillin-resistant S. aureus*) è una lunga storia, ormai, che ha inizio 45 anni fa in Gran Bretagna, con i primi sporadici isolamenti poco dopo l'introduzione della meticillina nella pratica clinica. MRSA è da più di un quarto di secolo il patogeno nosocomiale per eccellenza, eppure la sua storia epidemiologica è sempre stata capricciosa: e solo negli ultimi anni, grazie al progresso tecnologico che consente di sequenziare interi genomi e di analizzare vaste popolazioni batteriche con nuove tecniche di tipizzazione altamente discriminative e capaci di indagare le parti più conservate del genoma, si è cominciato a capire qualcosa sulla sua origine, e addirittura a delinearne una storia evolutiva. Se è vero che conosciamo da tempo sia la *penicillin-binding protein* a bassa affinità (PBP2a) responsabile della meticillino-resistenza sia il gene (*mecA*) che la codifica, è un fatto però che solo da poco abbiamo cominciato a conoscere l'elemento cromosomico (*SCCmec*) di cui il gene *mecA* fa parte, e a capire come le basi molecolari e genetiche della variabilità di MRSA e di molte delle sue caratteristiche biologiche siano associate all'eterogeneità di tale elemento. Negli ultimi anni stiamo poi assistendo a nuove emergenze, riguardanti MRSA, di impatto potenzialmente epocale, come la comparsa di ceppi clinici altamente resistenti alla vancomicina e la diffusione di MRSA al di fuori del tradizionale contesto ospedaliero, ossia nella comunità. Già c'è chi va preconizzando un nuovo

*trend* per MRSA: in ospedale, ceppi appartenenti a relativamente pochi cloni, sempre più multi-resistenti, anche ai glicopeptidi; e in comunità, ceppi tendenzialmente resistenti solo ai  $\beta$ -lattamici, ma più eterogenei e potenzialmente anche più patogeni.

#### S6.2

#### LA TIPIZZAZIONE GENICA PER DISCRIMINARE HA-MRSA E CA-MRSA

**Stefani S., Campanile F.**

Dipartimento di Scienze Microbiologiche  
Università degli Studi di Catania  
E-mail: stefanis@unict.it

In quanto a versatilità di strategie patogene, numero di fattori di virulenza e capacità di sopravvivere e moltiplicarsi in svariati ambienti, *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) risulta essere il microrganismo più flessibile, responsabile di infezioni gravi acquisite in ambiente ospedaliero e, più recentemente, in comunità. Gli MRSA hanno subito una forte spinta evolutiva, mediata dalla pressione selettiva causata dall'uso di un numero sempre maggiore di agenti antimicrobici. Sebbene l'applicazione delle metodiche classiche di tipizzazione molecolare (PFGE; RFPLs), insieme ai dati della MLST, abbiano permesso di intraprendere uno studio sulle correlazioni genetiche degli MRSA e predire il genotipo ancestrale dal quale discendono attualmente i cloni maggiormente diffusi, le ricerche relative alle sue basi genetiche sono sempre in continua evoluzione.

L'individuazione in cassette mobili del determinante della resistenza *mecA*, che codifica la PBP2a a bassa affinità per i  $\beta$ -lattamici, ha in parte risposto a molti interrogativi riguardo la diffusione della meticillino-resistenza, rimettendo in discussione la presunta origine di MRSA da un unico progenitore; infatti, alla mar-

cata clonalità si contrappone la variabilità dell'elemento *SCCmec*, che fa ipotizzare un trasferimento orizzontale realizzatosi all'origine tra diverse linee evolutive ancestrali.

La tipizzazione molecolare degli HA-MRSA ha fornito numerosi dati sulle relazioni intercorrenti tra i cloni più diffusi in ambito ospedaliero e i maggiori cloni internazionali, ma la comparsa di cloni ipervirulenti in comunità, sensibili alla maggior parte di antibiotici non- $\beta$ -lattamici, con differenti background genetici rispetto a quelli conosciuti, sottolinea la necessità di migliorare e armonizzare i metodi di rilevamento. Inoltre, recentemente nuovi cloni epidemici di MRSA che, paradossalmente, sono resistenti a un numero minore di classi di antibiotici dei cloni precedentemente endemici, si stanno diffondendo in diversi ospedali. *SCCmec* in CA-MRSA è di piccole dimensioni, privo di geni per la resistenza oltre a quello per la meticillina, e dotato di ricombinasi funzionali; inoltre, è spesso associato a molteplici geni della virulenza e spesso ai geni della Panton-Valentine leucocidine (PVL).

Ad oggi non esistono studi sulla possibile origine e sulla capacità di diffondere di CA-MRSA, contrastati anche dall'abilità di questi microrganismi di risiedere nella popolazione in modo asintomatico. Solo attraverso l'analisi comparata degli elementi *SCCmec* e del genotyping è possibile, oggi, mettere in evidenza le origini indipendenti degli H-MRSA e CA-MRSA.

#### Domande:

##### 1) Cosa si intende per *SCCmec* DNA?

- a) Una cassetta genica contenente DNA stafilococcico
- b) Elementi genetici contenenti almeno il gene *mecA*
- c) Elementi genetici mobili
- d) DNA sempre presente in tutti gli stafilococchi
- e) Nessuna di queste risposte

##### 2) *S.aureus* meticillino-resistente "community-acquired" è

- a) Più sensibile alla oxacillina
- b) Più sensibile agli antibiotici
- c) Responsabile di infezioni in ambiente ospedaliero
- d) PVL negativo
- e) *SCCmec* positivo

### S6.3

## CA-MRSA IN ITALIA E NEL MONDO

**Pantosti A.**

*Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), è stato tradizionalmente considerato un patogeno ospedaliero o comunque associato a pratiche ed ambienti di assistenza sanitaria. Alla fine degli anni '90, si è assistito da una parte ad una più frequente

comparsa di infezioni sporadiche da MRSA in individui che non avevano evidenti contatti con l'assistenza sanitaria, dall'altro a vere epidemie in particolari gruppi o comunità "semi-chiuse", quali bambini indiani-americani, bambini che frequentavano asili nido, detenuti, reclute, e componenti di squadre sportive. Le infezioni erano prevalentemente cutanee, ma anche insolitamente gravi. I ceppi MRSA isolati da queste infezioni, definiti CA-MRSA (cioè community-acquired o associated MRSA), apparivano diversi dai ceppi classici ospedalieri per caratteristiche fenotipiche e/o genotipiche. I ceppi CA-MRSA sono in genere sensibili ad antibiotici diversi dai  $\beta$ -lattamici, hanno un profilo genetico che ne caratterizza l'appartenenza a cloni diversi da quelli a cui appartengono MRSA ospedalieri e tipicamente contengono l'elemento di resistenza *SCCmec* di tipo IV. Inoltre spesso producono la tossina di Panton-Valentine (P-V), che è considerata un fattore di virulenza favorente i fenomeni necrotici. I dati sulla prevalenza e circolazione di CA-MRSA sono spesso confusi e discordanti a causa delle diverse definizioni adottate. In molti studi, soprattutto retrospettivi, la definizione è basata solo su criteri epidemiologici (presunta acquisizione dell'infezione in comunità oppure colonizzazione al momento dell'ospedalizzazione). In questi casi, soprattutto se non viene effettuata un'anamnesi accurata per escludere precedenti contatti del paziente, diretti o indiretti, con l'assistenza sanitaria, si rischia di sovrastimare la quota di CA-MRSA. Quando si seguono anche criteri microbiologici, si può descrivere con più accuratezza la quota di infezioni o colonizzazioni dovuta a ceppi con caratteristiche tipiche di CA-MRSA. In una metanalisi di studi condotti in varie parti del mondo, in prevalenza in Nord America ed in Europa, la frequenza di infezioni attribuite a CA-MRSA in pazienti ospedalizzati, sulla base di criteri esclusivamente epidemiologici, era del 30-37%. Tuttavia, la maggior parte dei pazienti presentava uno o più fattori di rischio per l'acquisizione di MRSA ospedalieri. Studi più recenti, in cui sono state prese in esame anche le caratteristiche fenotipiche e/o genotipiche dei ceppi, hanno dimostrato che < 1% dei soggetti in comunità senza fattori di rischio sono portatori di CA-MRSA. Questi ceppi sono in genere sensibili ad antibiotici diversi dai  $\beta$ -lattamici ma non tutti posseggono *SCCmec* di tipo IV, e soprattutto non posseggono tossina di P-V. Caratteristica è invece l'associazione tra tipici CA-MRSA ed infezioni: se si prendono in considerazione manifestazioni infettive insorte in comunità, quali infezioni cutanee in bambini o polmoniti gravi in individui giovani, allora i ceppi responsabili sono tipici CA-MRSA con *SCCmec* di tipo IV e tossina P-V. Per complicare il quadro, tipici CA-MRSA possono essere introdotti in ospedale e causare epidemie, come ad esempio tra neonati in reparti di neonatologia. I ceppi CA-MRSA, con *SCCmec* di tipo IV e P-V positivi, appartengono dal



punto di vista genetico ad un numero limitato di cloni, con diversa distribuzione geografica, distinguibili mediante profilo di macrorestrizione PFGE o meglio profilo allelico Multilocus Sequence Typing. Nel Nord America le infezioni da CA-MRSA sono dovute prevalentemente ai cloni USA 300 e USA 400, in Europa al clone ST80 e nell'area del Sud-Ovest Pacifico al clone ST30. Ceppi CA-MRSA tipici sono stati ritrovati in tutti i paesi in cui sono stati attivamente ricercati, anche in paesi con bassa prevalenza di ceppi MRSA ospedalieri, quali i paesi del Nord Europa. Per quanto riguarda l'Italia, benché vi siano sporadiche segnalazioni di infezioni da MRSA acquisite in comunità, non vi sono ampi studi sulla circolazione di tipici CA-MRSA. Noi abbiamo dimostrato che un ceppo produttore di tossina di P-V, appartenente al clone Sud-Ovest Pacifico ST30, aveva causato un quadro di polmonite necrotizzante in una giovane donna. Inoltre, abbiamo dimostrato la colonizzazione nasale da ceppi CA-MRSA con SCCmec di tipo IV ma P-V negativi, in residenti ed operatori di una casa di riposo. Sono in via di realizzazione studi più ampi per verificare la frequenza di infezioni e/o colonizzazioni da CA-MRSA nel nostro paese.

## S6.5

### IL CLINICO FRA MRSA E CA-MRSA

**Venditti M.**

Dipartimento di Medicina Clinica - Policlinico Umberto I.  
Università "La Sapienza" - Roma

L'isolamento di *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente (MRSA) è stato ritenuto per decenni un marker affidabile della origine nosocomiale delle relative infezioni. In tal senso questo microrganismo è ancora oggi tra le principali cause di gravi complicanze della degenza ospedaliera quali la polmonite, in particolare associata a ventilazione meccanica (gravata di mortalità ca. 50%), sepsi associate a catetere venoso centrale (complicabile con endocardite nel 20-25% dei casi) o ad altri dispositivi intra ed extravascolari, ed infezioni su ferita chirurgica associate o meno a corpo estraneo. Recentemente, tuttavia, l'evoluzione della assistenza medica ha comportato un significativo aumento della gestione domiciliare, con occasionali controlli ambulatoriali o in regime di "day hospital", fino a brevi ricoveri, di pazienti con vario stato di malattia cronica: basti pensare ai soggetti in terapia dialitica, gli emato-oncologici, i trapiantati d'organo ed un sempre crescente numero di anziani con polipatologie residenti in cronici. Ciò ha consentito la diffusione extranosocomiale di ceppi ospedalieri, multiantibioticoresistenti, di MRSA (HA-MRSA) in grado di causare nei suddetti pazienti "ad alto rischio" gravi infezioni ad insor-

genza in comunità ("community-onset": CO-HA-MRSA).

D'altro canto, sono anche sempre più frequenti le segnalazioni di infezioni in pazienti giovani, apparentemente in perfetta salute e senza i succitati fattori di rischio, causate da ceppi riconosciuti genotipicamente di origine comunitaria (CA-MRSA): si tratta di patogeni che sebbene meticillina resistenti non risultano multiantibioticoresistenti, e tuttavia capaci di un ventaglio di infezioni che vanno da innocue infezioni cutanee fino a gravissime sindromi a impronta necrotizzante, mediate dalla leucocidina di Panton-Valentine (PVL), quali la polmonite necrotizzante, la fascite necrotizzante e la sindrome di Waterhouse-Frideriksen.

In questo scenario, il clinico deve riconoscere precocemente l'etiologia stafilococcica potenzialmente meticillina-resistente sia dalla analisi dei fattori di rischio per i casi da CO-HA-MRSA, sia dalle conoscenze epidemiologiche di prevalenza di CA-MRSA nella area geografica di utenza dell'ospedale ove opera. Fondamentale potrebbe risultare il precoce riconoscimento delle sindromi necrotizzanti PVL-mediate che potrebbero essere più adeguatamente trattate con antibiotici che inibiscono la sintesi proteica (clindamicina o linezolid).

L'approccio terapeutico, include il drenaggio chirurgico delle raccolte ascessuali e terapie con vancomicina, teicoplanina, minociclina, clindamicina o linezolid, oltre nuovi interessanti farmaci quali la glycilglycina tygeciclina, o i nuovi glicopeptidi/lipopeptidi daptomicina, dalbavancina e telavancina.

# relazioni

## SESSIONE 7

### La Biologia Molecolare in microbiologia: stato dell'arte

Giovedì 21 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

#### S7.2

#### **RUOLO DELLA AMPLIFICAZIONE DIRETTA NELLA DIAGNOSTICA DELLA TBC: VANTAGGI, LIMITI, COSTO-EFFICACIA**

**Piersimoni C.**

*Gruppo di Studio Micobatteri AMCLI*

*E-mail: piersim@tin.it*

La diagnosi di laboratorio della Tubercolosi (TB) si può effettuare tramite i test di amplificazione diretta (DAT), anche se la loro sensibilità non raggiunge quella della coltura che rimane il "gold standard".

La positività dei DAT dipende dalla presenza del target (DNA o RNA) micobatterico nelle secrezioni respiratorie o dalla sua disseminazione nei liquidi biologici e/o nei prelievi bioptici.

Nei casi di malattia micobatterica bacillifera, la positività combinata di microscopia e DAT attesta una sicura diagnosi di tubercolosi attiva, mentre la positività microscopica associata con un DAT negativo in assenza di sostanze inibenti indica una malattia da micobatteri non tubercolari.

Il ruolo dei DAT diventa più importante in corso di TBC paucibacillare. In questo caso, purtroppo, alcune limitazioni delle tecniche attualmente in uso quali la insufficiente estrazione del target rendono la sensibilità dei DATs ancora troppo limitata specialmente nei campioni extrapulmonari.

Purtroppo, a fronte di prestazioni diagnostiche non straordinarie si registrano costi mediamente elevati almeno per quanto attiene ai kit commerciali che rappresentano i DAT di gran lunga più diffusi. Inoltre, i dati presenti in letteratura valutano questi test soprattutto dal punto di vista della performance analitica piuttosto che della reale utilità clinica.

E' necessario poter quantificare l'efficacia dei DAT ad

orientare l'iter diagnostico e la conseguente condotta terapeutica in diversi contesti clinici specialistici e non. Solo così sarà possibile valutarne la reale efficacia.

Nell'ambito della revisione delle metodologie diagnostiche per la TB attiva e latente, diventa fondamentale valutare la utilità clinica dei DAT in relazione alla stima della probabilità pre-test (sospetto clinico).

La successiva valutazione dei risultati alla luce della storia clinica e follow up dei singoli pazienti potrà consentire di predisporre una proposta di linee guida per il corretto utilizzo dei DAT in clinica.

#### S7.3

#### **IL RUOLO DELLA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE NEL CONTROLLO DELLA TRASMISSIONE NOSOCOMIALE DELLE INFEZIONI VIRALI**

**Ghisetti V., Allice T.**

*S.C. Microbiologia, Ospedale Molinette, corso Bramante 88, 10126 Torino*

L'applicazione delle tecniche molecolari in ambito epidemiologico ha aperto il campo al controllo delle diffusione nosocomiale di importanti virus quali quelli delle epatiti B e C, HIV, i virus respiratori e gli agenti di gastroenteriti, che rappresentano un'ampia fonte di infezioni nosocomiali, rispetto a cui l'adozione delle Precauzioni Universali non sempre è sufficiente a contenerne la diffusione.

Data l'elevata variabilità genotipica e di quasispecies dei virus, dal punto di vista clinico ed epidemiologico è opportuno prevedere l'integrazione delle tecniche convenzionali con altre avanzate per rispondere all'esigenza di identificare e differenziare rapidamente virus responsabili di patologie simili e tracciarne la

catena epidemiologica di diffusione, per approntare misure di contenimento nei reparti ad alto rischio (ematologie, oncologie, emodialisi e trapianti), e di profilassi e terapia nei pazienti esposti.

A questi requisiti rispondono piattaforme molecolari multiple e rapide, per l'identificazione differenziale di agenti virali mentre le tecniche di sequenziamento associate a studi di filogenesi consentono la tipizzazione degli isolati e la definizione della catena epidemiologica di trasmissione.

#### **Scopo.**

Allestimento di un sistema multiplo di real-time-PCR-TaqMan per l'identificazione e tipizzazione dei virus dell'influenza A (FluA) e B (FluB) nell'ambito del controllo nosocomiale dell'influenza nei reparti di oncoematologia.

#### **Materiali e metodi.**

Durante le stagioni 2004-2005 e 2005-2006 sono stati analizzati 82 materiali provenienti dalle vie respiratorie superiori di 64 pazienti in attesa di trapianto allogenico di cellule staminali. I risultati in real-time-PCR sono stati confrontati con quelli in PCR convenzionale. I campioni positivi sono stati sequenziati sul gene HA per stabilire la presenza di un cluster epidemico.

#### **Risultati.**

Mediante real-time-PCR sono stati identificati 18 campioni positivi per FluA (22%) e 4 per FluB (5%), 12 in più di quelli identificati con le tecniche di PCR tradizionali. 14 FluA appartenevano al sottotipo H3N2, 2 a H1N1, e 2 non erano tipizzabili. In accordo con i dati stagionali, nel 2004-2005 sono risultati positivi 13/30 (43%) campioni di cui 11 FluA e 2 FluB, mentre nel 2005-2006 solo 9/52 (17,3%: 7 FluA e 2 FluB). L'analisi della sequenza del gene HA dei campioni positivi in entrambe le stagioni, suggerisce la presenza di un unico cluster caratterizzato da una distanza filogenetica inferiore al 1,2%. In entrambe le stagioni è stata effettuata una profilassi specifica dei contatti con amantadina mentre e nei pazienti sintomatici è stato utilizzato un breve ciclo di terapia con inibitori della neuraminidasi virale, che ha risolto l'infezione senza complicazioni.

#### **Conclusione.**

La piattaforma di real-time-PCR associata all'analisi di sequenza degli isolati influenzali, è risultato strumento accurato, rapido, sensibile e specifico fornendo informazioni importanti nell'ambito della sorveglianza della diffusione dell'influenza nei reparti ad alto rischio, consentendo di attuare una corretta e pronta strategia di profilassi e terapia dei pazienti.

## **S7.4**

### **IL RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE NEL CONTROLLO DELLE INFEZIONI BATTERICHE NOSOCOMIALI E NELLA CARATTERIZZAZIONE DELLE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI**

#### **Carattoli A.**

*Dipartimento di Malattie Infettive,  
Parassitarie e Immuno-mediate,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Le infezioni ospedaliere sono sicuramente causa, oltre che di decesso, anche di invalidità temporanea o permanente. Per controllare e ridurre le infezioni ospedaliere è necessario che le strutture agiscano su più fronti, ma un protocollo di sorveglianza attiva delle infezioni che si manifestano e un appropriato flusso informativo, che permetta l'identificazione e la quantificazione delle infezioni stesse nei diversi presidi, è forse il punto fondamentale.

Uno dei fenomeni più preoccupanti dell'epidemiologia delle infezioni batteriche a livello mondiale è rappresentato dall'emergenza e dalla rapida disseminazione di microrganismi con resistenze ad antibiotici. I microrganismi più problematici da questo punto di vista sono gli enterococchi, gli stafilococchi meticillino-resistenti, i gram-negativi, la *Candida* e i micobatteri tubercolari multiresistenti.

I batteri possono sviluppare resistenza agli antibiotici mediante modificazioni del loro patrimonio genetico per mutazione, oppure mediante acquisizione di geni che conferiscono la resistenza. Quest'ultimo fenomeno è quello che maggiormente determina la rapida acquisizione e diffusione di resistenze ad uno o più antibiotici da parte dei batteri patogeni gram-negativi. L'acquisizione di resistenze mediante trasferimento orizzontale può avvenire anche tra batteri di specie diversa e rappresenta una rapida risposta adattativa dei batteri di fronte all'uso degli antibiotici. A livello nosocomiale il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è particolarmente veloce e a causa del largo uso di antibiotici, le popolazioni batteriche resistenti vengono rapidamente ed efficientemente selezionate rendendo problematico il trattamento terapeutico. Il controllo delle infezioni batteriche nosocomiali può essere affrontato mediante il monitoraggio delle popolazioni batteriche circolanti nell'ospedale, con particolare riferimento alla valutazione dell'incidenza e della prevalenza di ceppi resistenti ai farmaci di nuova generazione e più efficaci da un punto di vista clinico. La conoscenza dell'evoluzione della resistenza nei principali batteri patogeni, sia come studio della diffusione di particolari ceppi clonali, sia mediante studi molecolari dei geni

di resistenza e dei loro meccanismi di trasferimento è importante per comprendere l'evoluzione del fenomeno infettivologico.

Tra le specie batteriche che maggiormente evolvono verso una resistenza multipla agli antibiotici e che più facilmente acquisiscono geni di resistenza per trasferimento orizzontale ci sono *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, principali cause di infezioni polmonari, urinarie, e sistemiche di origine nosocomiale. In queste specie l'insorgenza di resistenze a farmaci di rilevanza clinica è in costante aumento in tutto il mondo e sono numerosi gli studi che dimostrano come l'insorgenza della resistenza in questi ceppi sia correlata con un aumento della degenza in ospedale per i pazienti e con un aggravamento delle condizioni generali. Per *Acinetobacter baumannii* le infezioni più pericolose riguardano i reparti di terapia intensiva in pazienti critici. In questi casi il sopraggiungere di una infezione può risultare letale per il paziente. La ricerca di base ha offerto negli ultimi anni degli strumenti di rilevamento diagnostico e caratterizzazione molecolare utili all'espletamento di queste indagini. Tuttavia, molti dei meccanismi che conferiscono la resistenza ai farmaci più recenti e più efficaci non sono ancora stati del tutto caratterizzati nei patogeni di rilevanza clinica, così come l'applicazione della biologia molecolare al riconoscimento dei ceppi clonali emergenti in determinati ambiti ospedalieri, non è alla portata di tutte le strutture né immediatamente disponibile in tempo reale per il contenimento delle emergenze infettivologiche.

# relazioni

## SESSIONE 9

### Il ruolo della diagnostica microbiologica nell'attività di trapianto e per la sicurezza trasfusionale

Venerdì 22 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

#### S9.1

#### MEDICINA RIGENERATIVA E PLASTICITÀ DELLE CELLULE STAMINALI ADULTE

**Ventura C.**

*Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali*

- Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi  
- Istituto di Cardiologia, Ospedale S. Orsola  
- Malpighi, Università di Bologna.

Le cellule staminali rappresentano elementi pluripotenti responsabili sia dello sviluppo di organi e apparati durante la vita embrionale, sia del mantenimento dell'integrità morfo-funzionale di alcuni tessuti nell'individuo adulto. La morte cellulare insorgente nel contesto di patologie degenerative acute o croniche comporta conseguenze cliniche in buona parte dipendenti dalle capacità rigenerative del tessuto danneggiato. Oggi sappiamo che il midollo osseo contiene cellule staminali adulte e fra queste le cellule staminali mesenchimali (hMSC). Si tratta di cellule che non hanno una funzione emopoietica ma possono differenziarsi in diversi fenotipi cellulari mostrando una potenzialità differenziativa di gran lunga superiore a quanto inizialmente ipotizzato. Queste cellule possono differenziarsi in cellule osse, cartilaginee, in epitelii cutanei e corneali. Per molti versi l'utilizzo di hMSC è già una realtà clinica in campo ortopedico, dermatologico e oculistico. Numerose evidenze sperimentali indicano un potenziale cardiogenetico e neurogenetico in hMSC. Tali cellule manifestano inoltre la capacità di esprimere markers dei tre foglietti embrionali e sono capaci di differenziarsi anche in cellule beta-pancreatiche. Molte ricerche sono attualmente in atto per comprendere i meccanismi molecolari in grado di "convincere" le hMSC ad adottare queste scelte differenziati-

ve. Un altro aspetto di estremo interesse è dato dal riscontro di hMSCs in tessuti alternativi al midollo osseo, quali la polpa dentaria e le membrane fetali della placenta a termine. Quest'ultima popolazione cellulare sembra essere più ancestrale e dotata di capacità proliferative e di autorinnovamento particolarmente spiccate. Anche in questo caso, le cellule hMSCs ottenute non danno luogo a fenomeni di rigetto in seguito a trapianto eterologo anche in speci diverse dall'uomo. Questa caratteristica è estremamente interessante perché consentirà in un immediato futuro di studiare le potenzialità differenziative e riparative di cellule staminali umane in modelli sperimentali animali di danno d'organo.

Le potenzialità differenziative e di "autorinnovamento" delle cellule staminali hanno recentemente suggerito un nuovo approccio al danno tissutale, quello della "terapia cellulare". Il successo della terapia cellulare dipenderà dalla comprensione dei meccanismi molecolari responsabili dell'induzione e del mantenimento di differenzamenti specifici nelle cellule staminali. La maggior parte di tali meccanismi resta attualmente sconosciuta. Le implicazioni della scoperta degli eventi molecolari che governano l'orientamento fenotipico delle cellule staminali risultano immediatamente evidenti nella prospettiva di una terapia cellulare di alcuni specifici tessuti, quali il miocardio e il sistema nervoso centrale e periferico. Le ricerche più recenti nel campo delle cellule staminali hanno ricevuto un impulso fondamentale dall'analisi dei meccanismi molecolari responsabili dell'orientamento differenziativo verso specifici fenotipi. In questo contesto, un'area di ricerca in rapido sviluppo è rappresentata dalla comprensione degli effetti indotti da modificazioni epigenetiche quali l'acetilazione di istoni e la metilazione del DNA sull'attività trascrizionale e sul rimodellamento della struttura e della funzione della cromatina. L'isolamento e la caratterizzazione di molecole chiave coinvolte in tali modificazioni epigenetiche indica che una varietà di fattori cooperano nella costruzione di vasti complessi che dirigono l'assemblaggio di specifici



che conformazioni dei nucleosomi, capaci a loro volta di regolare l'attivazione o la repressione trascrizionale. In particolare, il passaggio da uno stato di totipotenza ad una condizione di orientamento fenotipico in cellule multi/totipotenti potrebbe essere spiegato, almeno in parte, dall'insorgenza di complessi rimodellamenti della struttura cromatinica. L'acetilazione di istoni è stata a lungo associata all'attivazione trascrizionale e ad un incremento delle capacità differenziali in toto di cellule multipotenti. Le risposte cellulari associate ad iperacetilazione istonica sono risultate essere fortemente potenziate in presenza di inibitori delle metiltransferasi, quali la 5-aza-2'-deoxytydine (5-aza). E' stato evidenziato come la concomitante inibizione di istone deacetilasi, con conseguente iperacetilazione istonica, e l'inibizione di DNA metiltransferasi aumentassero ulteriormente la stessa acetilazione istonica, provocando un'induzione sinergica dell'attività trascrizionale.

Abbiamo recentemente sviluppato esteri misti di acido ialuronico con acido retinoico e acido butirrico, inibitore delle istone deacetilasi, che sono risultati essere in grado di indurre l'attivazione di profili di espressione genica responsabili del differenziamento cardiaco in cellule embrionali staminali totipotenti murine (Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Scarlata I, Cantoni S, Perbellini A. *J Biol Chem* 279:23574-23579, 2004). Gli effetti prodotti a livello trascrizionale dagli esteri misti dell'acido ialuronico si sono tradotti in un drammatico aumento della resa del processo cardiogenetico.

Questi risultati dimostrano per la prima volta che il programma differenziale delle cellule staminali può essere chimicamente modificabile senza ricorrere a procedimenti complessi e potenzialmente rischiosi di trasferimento genico mediante vettori virali. Tale scoperta potrebbe aprire la strada verso approcci innovativi di bioingegneria tissutale e rigenerazione miocardica.

## S9.2

### **DONATORI MULTIORGANO E MARGINALI: CRITERI MICROBIOLOGICI DI IDONEITÀ**

**Ghisetti V.**

*S.C.Microbiologia, Ospedale Molinette, corso Bramante 88, 10126 Torino*

Data la scarsità di organi disponibili e la disparità con il numero dei riceventi in lista di attesa si è vista la necessità di espandere il pool di donazioni definendo strategie elettive per l'utilizzo di organi da donatori a rischio cosiddetto "calcolato". Rientrano in tale situazioni donatori in cui la presenza di uno specifico agen-

te patogeno o di uno stato sierologico depongono per un potenziale rischio di trasmissione di agenti infettivi. Tali situazioni sono compatibili con il trapianto in riceventi che presentino condizioni tali da rendere minimo il rischio di trasmissione perché anch'essi affetti dallo stesso tipo di infezione oppure provvisti di anticorpi specifici e quindi protetti (CNT, 26 novembre 2003). Il laboratorio di Microbiologia riveste un ruolo sempre più importante nella valutazione delle situazioni di marginalità della donazione d'organo perché è necessaria una tipizzazione microbiologica sensibile, specifica, accurata e rapida per definire le condizioni di rischio di trasmissione degli agenti infettivi al ricevente e l'idoneità alla donazione. L'introduzione delle tecniche molecolari per l'identificazione dei virus epatitici B (HBV), C (HCV) e HIV in soggetti sierologicamente negativi o con segni di infezione pregressa ha migliorato molto la definizione del rischio associato alla donazione, come anche la disponibilità di farmaci antivirali per la profilassi specifica di certe infezioni (HBV) nei riceventi a rischio.

Le condizioni di donazione a rischio calcolato sono le seguenti:

- a) donatori HbsAg positivi;
- b) donatori HbsAg negativi ma con sierologia positiva per HBV;
- c) donatori anti-HCV positivi;
- d) donatori con meningite o batteriemici MA in trattamento antibiotico da almeno 24 ore.

L'esperienza di molto Centri circa l'utilizzo di organi con infezione da HCV in riceventi HCV positivi ha messo in evidenza che la sopravvivenza a 5 anni di tali pazienti è molto simile a quella dei pazienti HCV positivi con donatori anti HCV negativi. Più problematico è l'uso di organi da donatori HbsAg positivi o con pregressa infezione da HBV (portatori occulti). Nei Centri dove si eseguono trapianti di fegato da donatori HbsAg positivi, in riceventi HbsAg positivi ad esclusione delle coinfezioni da virus Delta, il follow-up di tali pazienti ha evidenziato che nonostante una profilassi combinata con immunoglobuline specifiche e antivirali nessuno dei riceventi elimina il virus B, tutti rimangono HbsAg positivi richiedendo una terapia antivirale prolungata, con elevato rischio di sviluppare farmacoresistenza. L'infezione occulta da HBV è rivelabile nel siero dalla positività per anticorpi contro il core di HBV (anti-HBc) in soggetti HbsAg negativi, associata o meno alla presenza di altri indicatori sierologici di pregresso contatto con il virus. Tale condizione è molto frequente nelle popolazioni dei donatori di organo (24% in Italia, dati NIT del 2005), più alta che nella popolazione generale (valori intorno al 5%) e si associa ad un rischio di trasmissione di HBV con il trapianto di fegato che va dal 30 al 70% dei casi, in assenza di profilassi del ricevente. I test molecolari sui materiali biologici di tali donatori hanno evidenziato che solo una piccola frazione di essi è positiva per HBV DNA nel siero (non oltre il 10% con cariche vira-

li inferiori alle 1000 copie/ml), mentre circa il 30% di essi presenta il virus nel fegato, in carica molto modesta, ma tale da confermare che circa un terzo dei soggetti HbsAg negativi anti-HBc positivi è portatore occulto del virus.

Da questi dati emerge l'importanza dell'integrazione tra la fase clinico-immunologica e quella microbiologica per la tipizzazione del donatore al fine di una definizione accurata del rischio di trasmissione di agenti infettivi e dell'idoneità alla donazione e al trapianto.

## S9.4

### **ESPERIENZE NELLA SORVEGLIANZA DELLA INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS UMANO NEL PAZIENTE TRAPIANTATO D'ORGANO SOLIDO E DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE**

**Lilleri D., Gerna G.**

*Servizio di Virologia, IRCCS Policlinico "San Matteo", Pavia*

Le infezioni da citomegalovirus umano (HCMV) rimangono le maggiori complicanze del periodo post-trapianto nei pazienti riceventi trapianto di cellule staminali ematopoietiche e di organo solido, a causa della potente terapia immunosoppressiva cui questi pazienti sono sottoposti.

L'infezione da HCMV può essere sistemica (alta carica virale nel sangue associata a febbre, leucopenia e trombocitopenia) o localizzata (sintomi clinici di infezione virale nel singolo organo [e.g. polmoni] o apparati [tratto gastrointestinale]). I due tipi di infezione possono inoltre presentarsi associati. Le infezioni sistemiche da HCMV possono venire diagnosticate su campioni di sangue attraverso l'esecuzione di saggi di antigenemia o DNAemia: entrambi i saggi sono di tipo quantitativo. Le infezioni localizzate possono essere diagnosticate mediante l'isolamento del virus, la ricerca del DNA virale o saggi immunoistochimici eseguiti su tessuti biotici o secrezioni (e.g. liquido di lavaggio bronco-alveolare). Diverse strategie possono essere applicate la prevenzione della malattia da HCMV: negli USA si utilizza un approccio profilattico (ossia la somministrazione di farmaci antivirali a tutti i pazienti trapiantati nei primi mesi dopo il trapianto), mentre l'approccio presintomatico, che è più comune in Europa, consiste nella somministrazione mirata dell'antivirale solo in quei pazienti che presentano nel sangue una predeterminata carica virale indicativa del rischio di sviluppare la malattia. Questo approccio necessita di un monitoraggio virologico stretto dei pazienti nei primi tre mesi dal trapianto. Il simultaneo follow-up virologico ed immunologico potrebbe rap-

presentare il migliore metodo per un efficiente monitoraggio delle infezioni da HCMV nei trapiantati. Infatti, la mancata ricostituzione o sviluppo di una efficace immunità anti-HCMV induce ripetuti episodi di infezione che necessitano molteplici cicli di trattamento antivirale, mentre una ricostituzione di una risposta immune cellulo-mediata sia CD4+ che CD8+ porta al controllo a lungo termine dell'infezione.

## S9.5

### **IL RUOLO DEL MICROBIOLOGO CLINICO NELLA SICUREZZA TRASFUSIONALE: OBIETTIVI ATTUALI E PROSPETTIVE FUTURE**

**Magliano E., Ursitti A.\***

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Microbiologia e Virologia, Università degli Studi, Milano*

*\* Servizio di Microbiologia, Ospedale "Sandro Pertini", Roma*

Nonostante l'accurata selezione dei donatori e l'introduzione di test di screening sierologici e molecolari, il rischio di contrarre infezione attraverso prodotti trasfusionali è oggi notevolmente ridotto ma ancora presente.

La ricerca di agenti infettivi attraverso test di screening pre-trasfusionali mostra significative differenze tra i vari Paesi a causa della diversa distribuzione geografica degli agenti infettivi e, per alcuni di questi, per i dubbi ancora esistenti sul loro reale potere patogeno. Gli agenti infettivi di sicura rilevanza clinica per l'uomo, trasmissibili attraverso prodotti trasfusionali (sangue ed emoderivati), ed ampiamente diffusi nel mondo sono HIV 1/2, HBV, HCV, HTLV I e II, CMV, Parvovirus B19, HAV e *Treponema pallidum*. Lo screening per tali patogeni è obbligatorio anche se con alcune differenze in vari Paesi, tra cui Francia, USA, Giappone, Germania, Olanda, Portogallo, Svezia e Regno Unito.

In Italia lo screening è obbligatorio solo per AIDS (anti HIV1/2), epatite C (anti HCV e HCV-NAT), epatite B (HBsAg) e sifilide (ricerca degli anticorpi). La diffusione di metodiche in grado quindi di identificare il marcatore di infezione sotto forma di antigene o anticorpo ha permesso di introdurre il concetto di periodo finestra, definito come tempo che intercorre tra momento dell'infezione e comparsa in circolo di anticorpi (periodo finestra anticorpale) o proteine virali a livelli determinabili (periodo finestra antigenico). Al fine di ridurre il periodo finestra per garantire la massima sicurezza trasfusionale possono essere utilizzate metodiche, caratterizzate da elevata sensibilità e specificità, in grado di identificare i vari agenti patogeni attraverso la determinazione dei rispettivi acidi nucleici.

In Italia dal 2002 è stato introdotto lo screening obbli-

gatorio per HCV-RNA; non esiste invece una presa di posizione ufficiale da parte delle Autorità Sanitarie Nazionali sull'estensione dello screening NAT anche all'HIV-RNA e HBV-DNA, anche se in diverse regioni esso viene eseguito sulla base di singole delibere regionali.

Mentre la diffusione di tali metodiche ha contribuito a ridurre il rischio della trasmissione delle malattie virali, particolare attualità ed interesse assume invece la possibilità di contaminazione batterica degli emocomponenti, in particolare dei concentrati piastrinici.

Se infatti il rischio di infezione batterica per trasfusione di globuli rossi è molto basso (negli USA 1 decesso/anno, a fronte di circa 14 milioni di unità trasfuse ogni anno), e legato soprattutto ad infezioni da batteri Gram negativi, le caratteristiche della trasfusione piastrinica predispongono più facilmente ad un rischio di infezione batterica. Le piastrine vengono infatti conservate tra 20 e 24° C, e questo le rende un ottimo terreno di coltura per la crescita di batteri, soprattutto Gram positivi, appartenenti alla flora batterica cutanea residente o transitoria del donatore, come *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*.

Il rischio di ricevere piastrine contaminate da batteri viene considerato da 10 a 1000 volte più alto di quello relativo ad infezioni virali da HIV, HBV, HCV e HTLV, con rischio di contaminazione della singola unità piastrinica compreso tra 1/2000 e 1/3000 unità e rischio di mortalità per grave reazione settica in 1 caso su 50.000 trasfusioni.

I metodi di prevenzione del rischio di infezione batterica prevedono la massima attenzione nella scelta del donatore con accurata preparazione e disinfezione della cute, la rimozione dei primi 10-30 ml di sangue della donazione, e l'uso preferenziale di piastrine da aferesi rispetto a concentrati piastrinici da sangue intero.

Per la rivelazione dei batteri possono essere utilizzati diversi metodi, che vanno dai sistemi automatici e semiautomatici di coltura batterica, anche in fase liquida, alla rivelazione attraverso tecniche di biologia molecolare. Queste ultime, per la loro elevata sensibilità e specificità e per la notevole rapidità di esecuzione, rappresentano teoricamente un metodo ideale per rilevare una contaminazione batterica di emocomponenti. Già attualmente è possibile la ricerca di DNA batterico attraverso l'ibridazione con sonde specifiche su coltura oppure per mezzo di PCR real-time con amplificazione del 16S rRNA. Esiste inoltre la possibilità di identificare batteri dopo marcatura con antibiotici fluorescenti, attraverso l'evidenza di componenti della parete batterica, con metodi dielettroforetici, per mezzo di colorazione di Gram o arancio acridina, o indirettamente attraverso la rivelazione di endotossine o misura del grado di produzione di CO<sub>2</sub> e di O<sub>2</sub>.

Quanto finora ricordato evidenzia chiaramente il ruolo rilevante ed insostituibile del microbiologo clinico nei programmi per la sicurezza trasfusionale, ovviamente nell'ambito di una gestione multidisciplinare aperta a

tutte le professionalità coinvolte nelle fasi di donazione degli emocomponenti. Tale coinvolgimento implica l'obbligo per il microbiologo clinico di acquisire le conoscenze, anche tecniche, gestionali e medico-legali, indispensabili per una sua ottimale integrazione con tutti gli altri settori coinvolti nella donazione, come la medicina trasfusionale, l'ematologia clinica e la chirurgia dei trapianti d'organo.

# relazioni

## SESSIONE 10

### Le nuove beta lattamasi: aspetti diagnostici e impatto clinico

Venerdì 22 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, Sala LONDRA

---

#### S10.3

---

#### **IMPATTO CLINICO DELLE BETA-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO: FATTORI DI RISCHIO E TRATTAMENTO TERAPEUTICO**

**Cauda R.**

*Istituto di Clinica delle Malattie Infettive  
Università Cattolica Sacro Cuore - Roma*

Attualmente è sempre più evidente il ruolo nella pratica clinica, anche nella nostra realtà italiana, delle infezioni causate da germi Gram negativi, soprattutto enterobatteri, specie *E. coli*, ma non solo, i cui meccanismi di resistenza sono legati a  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso.

La diffusione di questo tipo di infezioni pone innegabili problematiche sia di tipo diagnostico che terapeutico anche in considerazione del fatto che sono ancora pochi gli studi che analizzano nel dettaglio le caratteristiche cliniche delle infezioni causate da germi Gram negativi ESBL produttori rispetto alle stesse infezioni causate da germi non produttori.

Presso il Policlinico Universitario A. Gemelli di Roma nel corso degli ultimi anni abbiamo condotto una serie di studi volti a valutare le caratteristiche cliniche, i fattori di rischio e le strategie terapeutiche di questo tipo di infezioni. Sono state in particolare studiate, per i parametri sovramenzionati, le sepsi causate da *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. stuartii*.

Dalla nostra esperienza, in linea con quanto pubblicato in letteratura, risulta appieno la gravità di queste forme morbose anche per le difficoltà connesse con l'istituzione di una efficace terapia.

Quindi, si può concludere affermando che oggi le infezioni da germi Gram negativi ESBL produttori rappresentano per il clinico, in particolare situazioni, una vera e propria emergenza epidemiologica, che

pone problematiche terapeutiche spesso di assai difficile risoluzione specie per quel che attiene il tipo di antibiotico da impiegare.