

relazioni

SESSIONE I

Epidemiologia molecolare in microbiologia

Mercoledì 3 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, SALA BLU

S1.1

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI VIRUS INFLUENZALI

Donatelli I.

L'influenza costituisce un importante problema di Sanità Pubblica a causa della ubiquità, contagiosità, e variabilità antigenica dei virus influenzali, dell'esistenza di serbatoi animali e delle possibili gravi complicanze. Frequente motivo di consultazione medica e di ricovero ospedaliero, e principale causa di assenza dal lavoro e da scuola, l'influenza è ancora oggi la terza causa di morte in Italia per patologia infettiva, preceduta solo da AIDS e tubercolosi.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità già dagli anni '50 ha avviato un programma internazionale di sorveglianza per l'influenza, al quale partecipa anche l'Italia, fin dagli anni 60.

Il programma si basa su attività di sorveglianza clinico/epidemiologica e virologica. L'obiettivo generale del sistema di sorveglianza epidemiologico è quello di costituire una base di dati per valutare in modo comparativo l'incidenza dell'influenza nel corso degli anni.

La sorveglianza virologica si basa invece sullo studio delle caratteristiche antigeniche delle varianti circolanti in periodo epidemico. Infatti l'epidemiologia dell'Influenza è fortemente influenzata dalla capacità dei virus influenzali di mutare rapidamente le caratteristiche antigeniche delle due proteine virali di superficie, l'emagglutinina (H) e la neuraminidasi (N).

Tali variazioni permettono al virus di superare le barriere anticorpali che si oppongono alla sua circolazione nella popolazione, vanificando l'immunità conseguente a pregressa infezione naturale o a vaccinazione. I cambiamenti a carico di queste due proteine virali possono essere di diversa intensità; diversi sono anche i meccanismi molecolari che li determinano e la gravità delle manifestazioni morbose che ne derivano:

Drift antigenico: porta alla comparsa di varianti anti-

geniche minori, a seguito di mutazioni puntiformi che alterano la sequenza degli aminoacidi di cui sono composte le due proteine;

è un fenomeno comune a tutti i tipi (A, B, e C) e sottotipi virali (A/H3N2, A/H1N1);

è responsabile delle epidemie stagionali.

Shift antigenico: è un fenomeno esclusivo di virus di tipo A; consiste nella comparsa nell'uomo di nuovi sottotipi antigenici, non circolanti precedentemente nella specie umana e quindi dotati di elevato potenziale pandemico (rapida diffusione nella popolazione mondiale, indipendentemente dall'età e dalla situazione vaccinale); è la conseguenza di riassortimenti genetici tra virus umani ed animali (aviari), che si verificano principalmente nel corso di infezioni miste, in ospiti intermedi (specie suina). Occasionalmente, tuttavia, si può avere un passaggio diretto di virus aviari all'uomo, come avvenuto nel 1997 ad Hong Kong (trasmissione di virus A/H5N1 dal pollo all'uomo).

Risulta dunque evidente, che per realizzare una efficace azione di controllo della malattia attraverso l'immunoprofilassi vaccinale, occorre procedere ad un continuo aggiornamento della composizione del vaccino, in relazione alla comparsa di nuove varianti virali.

La sorveglianza virologica dell'influenza è svolta da una rete di laboratori in tutto il mondo, (in Italia il Centro Nazionale di riferimento è presso il Dipartimento "Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate" (MIPI), Reparto "Malattie virali e vaccini inattivati" dell'ISS, che rimane il punto cardine del Programma Mondiale di Sorveglianza dell'Influenza dell'O.M.S. Il sistema di sorveglianza sentinella italiano si inserisce in questo contesto mondiale di attività di sorveglianza accorpando, a livello nazionale, il monitoraggio virologico a quello clinico. Particolarmente importante al fine del raggiungimento degli obiettivi sopra descritti è lo studio dell'epidemiologia molecolare dei virus influenzali sia umani che aviari. Le metodologie impiegate e i risultati conseguiti in questo ambito dal Centro Nazionale dell'ISS vengono presentati.

S1.2

**ANALISI MOLECOLARE DI HPV
GENITALI AD ALTO RISCHIO
IN LESIONI CERVICALI MONITORATE
NELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA**
Zerbini M.L.
*Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e
Sperimentale, Università di Bologna*

L'infezione da HPV può causare lesioni epiteliali di diverso grado. Da studi epidemiologici emerge infatti che la persistenza d'infezioni da HPV ad alto rischio oncogeno precede e predice lo sviluppo in senso maligno delle lesioni squamose intraepiteliali. In questi ultimi anni quindi, 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.

Nel nostro laboratorio sono stati analizzati, nel periodo 2001-2006, 7113 campioni citologici eso-endocervicali di pazienti in età compresa tra i 16 e gli 80 anni (età media 36.68), l'incremento degli esami effettuati in questo periodo è stato del 232 %. Dei 7113 campioni citologici esaminati, 6932 sono stati analizzati mediante test di ibridazione con amplificazione del segnale (HCII) e 968 analizzati e tipizzati mediante PCR-ELISA.

Considerando che i campioni che pervengono al laboratorio non provengono da donne inserite nel programma di screening regionale, ma provengono da pazienti che presentano già, nella maggior parte dei casi, alterazioni citologiche e/o cliniche, la positività osservata è rispettivamente del 34,43% per il test HCII e del 56,61% per la PCR-ELISA, essendo di norma la PCR-ELISA un test di secondo livello rispetto all'HCII.

I genotipi identificati mediante PCR-ELISA sono gli alti rischi 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58, con una prevalenza rispettivamente del 28,37% 5,31% 11,84% 7,55% 3,06% 1,84% 6,33% 6,53%; sono inoltre tipizzati i bassi rischi 6 ed 11 con prevalenza rispettivamente del 3,47% e del 1,43%, il 24,29% dei campioni rimane non tipizzato. Nel 12,4% dei campioni è stata riscontrata un'infezione mista.

Sono state inoltre analizzate circa 350 pazienti trattate chirurgicamente per lesioni di alto grado, circa 150 di queste pazienti sono state seguite per un follow up di almeno 12 mesi dal trattamento. Nell'ambito di questo follow up sono stati studiati diversi parametri molecolari virali e cellulari che possono essere attualmente considerati marker di malattia quali: carica

virale, stato fisico ed espressione degli mRNA degli oncogenivirali E6/7, è stato inoltre messo a punto un metodo quantitativo per l'analisi della proteina cellulare P16, la cui sovraespressione è correlata all'attivazione della oncoproteina E7 degli HPV ad alto rischio.

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 ci possono fornire informazioni sullo stadio e sull'evoluzione della malattia.

S1.3

**LA TIPIZZAZIONE GENOTIPICA NEL
CONTROLLO DELLE INFEZIONI.
STATO DELL'ARTE**
Facinelli B.
*Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche
- Facoltà di Medicina e Chirurgia
- Università Politecnica delle Marche*

Il controllo delle infezioni prevede l'identificazione dei microrganismi responsabili, l'individuazione dei possibili serbatoi e delle vie di trasmissione, e l'interruzione della trasmissione. Negli ultimi anni, l'aumento delle infezioni nosocomiali, spesso associato al fenomeno della farmaco-resistenza, ha reso imperativo questo controllo. Le infezioni nosocomiali sono molto spesso il risultato dell'esposizione ad un serbatoio comune di infezione. I microrganismi più frequentemente coinvolti appartengono a specie molto comuni e spesso sono geneticamente correlati. In questi casi, l'identificazione a livello di specie non consente di seguire la circolazione del ceppo epidemico, in quanto è difficile distinguere tra colonizzazione ed infezione. E' quindi necessario tipizzare, cioè mettere in evidenza marcatori specifici presenti nel ceppo epidemico ed assenti nei ceppi della stessa specie non correlati. Il Laboratorio di Microbiologia partecipa attivamente al controllo delle infezioni, in quanto possiede gli strumenti necessari per identificare e tipizzare i microrganismi responsabili. Prima dello sviluppo delle tecniche basate sul DNA, la tipizzazione microbiologica si avvaleva di tecniche in grado di mettere in evidenza differenze nel fenotipo (biochimiche, sierologiche, di sensibilità o di resistenza ad antibiotici, sali di metalli pesanti, fagi, batteriocine, etc.). La biotipizzazione, ancora oggi un metodo relativamente valido, presenta lo svantaggio di essere per lo più microrganismo-specifica. La tipizzazione genotipica, invece, avvalendosi di tecniche mutate dalla biologia molecolare ed analizzando

il genoma, è universale, cioè applicabile a tutti i microrganismi. La tipizzazione genotipica è uno strumento epidemiologico perché permette di stabilire la relazione (distanza) genetica tra gli isolati, cioè permette di seguire la circolazione dei microrganismi e di individuarne il serbatoio. Mediante tipizzazione genotipica è possibile analizzare il genoma batterico sia nella parte più conservata (*core gene pool*: geni che assolvono funzioni chiave per la vita della cellula) che nella parte variabile (*flexible gene pool*: geni localizzati su plasmidi, transposoni, fagi, isole genomiche), responsabile dell'evoluzione accelerata. La scelta di un metodo piuttosto di un altro molto spesso dipende dal tipo di quesito epidemiologico a cui si deve rispondere (epidemie localizzate nel tempo e nello spazio oppure epidemie a lungo termine o su vasta scala) e dal tipo di microrganismo da tipizzare. È importante sottolineare che nessun metodo di tipizzazione presenta tutti i requisiti richiesti (standardizzabile, sensibile, di semplice esecuzione e facile interpretazione, economico, etc.). L'applicazione combinata di più metodi è spesso necessaria per delineare un profilo specifico degli isolati. La relazione ha come obiettivo quello di inquadrare lo stato attuale della tipizzazione genotipica.

S1.4

TRASMISSIONE ORIZZONTALE E DIFFUSIONE INTERSPECIFICA DELLE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI IN BATTERI GRAM-NEGATIVI

Carattoli A.

Istituto Superiore di Sanità - Roma

Il trasferimento orizzontale mediante plasmidi rappresenta il più frequente meccanismo di diffusione delle resistenze agli antibiotici nei batteri Gram-negativi. Il fenomeno della resistenza multipla è anch'esso legato alla disseminazione di elementi genetici localizzati sui plasmidi (integroni, transposoni) in grado di mobilitare simultaneamente diversi geni di resistenza, promuovendone il trasferimento tra batteri di specie diversa. Questi elementi genetici si sono evoluti e continuano ad evolversi mediante l'acquisizione di nuovi geni di resistenza e di nuove combinazioni di geni.

Studi internazionali recenti hanno evidenziato elementi genetici di resistenza comuni e frequenti nelle popolazioni di *Enterobacteriaceae* di origine nosocomiale e comunitaria circolanti in Europa. In particolare sono stati ampio oggetto di studio gli elementi responsabili della diffusione delle beta-lattamasi di maggior rilevanza clinica quali le CTX-M e altre beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e le resistenze

ai fluorochinoloni mediate da plasmidi. Il fenomeno della trasmissione di questi elementi è legato a disseminazione inter e intra-ospedaliera ma in alcuni casi è possibile rilevare una diffusione animale-uomo. La diffusione di plasmidi emergenti, a largo spettro d'ospite, responsabili della disseminazione di geni di resistenza rilevanti da un punto di vista clinico e la loro epidemiologia in Europa saranno presentati come argomenti di aggiornamento e discussione delle eventuali strategie di contenimento del fenomeno.

S1.6

GRUPPI FILOGENETICI E DETERMINANTI DI VIRULENZA IN *E. COLI*

Fortina G., Caroppo, S.

Premesse. *Escherichia coli* (*E. coli*) è nell'uomo la più frequente causa di infezioni extra-intestinali da batteri gram-negativi. Studi recenti suddividono la specie in quattro principali gruppi filogenetici, A, B1, B2 e D.

È inoltre noto che numerosi fattori di virulenza conferiscono ad *E. coli* la capacità di causare infezioni sistemiche.

Metodi. Novantaquattro ceppi di *E. coli*, isolati dal distretto ematico (25), urinario (32), respiratorio (12) ed intestinale (25), sono stati classificati nei quattro principali gruppi filogenetici mediante una multiplex PCR su tre sequenze di DNA caratteristiche dei diversi genotipi.

Sui ceppi in esame sono stati ricercati mediante PCR i marker per 29 fattori di virulenza, rappresentati da fimbrie, siderofori, antigeni capsulari, tossine, fattori di resistenza sierica ed isole di patogenicità.

Oltre a ciò, i ceppi raccolti sono stati sottoposti a rep-PCR e ad una successiva analisi di clustering, per evidenziare eventuali similarità a livello di profilo molecolare, anche in rapporto al corredo di virulenza.

Risultati. Si è rilevata una prevalenza dei genotipi B2 e D nelle emocolture (in entrambi i casi il 32% dei ceppi), a fronte di una maggior frequenza del genotipo A nelle feci (52%) e nei campioni respiratori (66%). Nelle urine i genotipi più rappresentati sono risultati B2 (56%) ed A (31%). È stato possibile evidenziare un maggior numero di elementi di patogenicità nei gruppi B2 e D rispetto ad A e B1 (8 vs 3; $p < 0.001$). Alcuni di essi (fimbrie S, F1C, P, fattore necrotizzante di tipo 1, α -emolisina, isole di patogenicità, capsula e fattore d'invasione dell'endotelio cerebrale) sono risultati più frequentemente presenti nei filogruppi B2 e D rispetto ad A e B1.

L'analisi di clustering ha raccolto 78 dei 90 campioni saggiati in due cluster, il primo costituito nel 96,77% dei casi dai gruppi filogenetici B2 e D, il secondo nel

91,5% dei casi da A e B1.

Discussione. I gruppi filogenetici più frequentemente responsabili di patologia sono risultati B2 e D, presenti nei campioni di sangue o urine nel 63% dei casi e nei campioni fecali solo nel 24% dei casi ($p=0.005$). L'analisi delle percentuali d'isolamento dei genotipi patogeni dai vari materiali sembrerebbe suggerire che per i ceppi di gruppo B2 il passaggio al circolo ematico possa avvenire a partire dal distretto urinario, mentre per i ceppi di gruppo D la provenienza urinaria sembra improbabile.

Si è inoltre evidenziata una correlazione tra un certo corredo di fattori di virulenza e la capacità invasiva del microrganismo che li possiede, suggerendo la possibilità di utilizzare questi elementi di patogenicità come markers prognostici di maggior capacità di disseminazione.

relazioni

SESSIONE 2

Nuovi sviluppi e prospettive nel campo dei vaccini, degli antivirali e dell'infezione da HIV

Mercoledì 3 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

S2.4

NUOVE PROSPETTIVE NEL MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE DA HIV

De Rossi A.

*Dipartimento di scienze Oncologiche e Chirurgiche,
Sezione di Oncologia, Unità di Virologia Oncologica,
Centro Riferimento AIDS, Università di Padova*

Nella infezione da HIV, la cinetica di replicazione virale e i livelli di viremia sono marcatori importanti per la progressione di malattia. L'introduzione della terapia HAART, determinando una drastica caduta della replicazione virale, ha causato un sostanziale cambiamento della storia naturale dell'infezione. L'infezione tuttavia persiste, anche se a livelli non rilevabili, e viene mantenuta per:

- i) sopravvivenza a lungo termine di cellule latentemente infettate,
- ii) bassi livelli di replicazione virale,
- iii) persistenza del virus in reservoir tissutali.

Benchè l'eradicazione dell'infezione sia incompatibile con il ciclo biologico virale, nuove strategie immunobiologiche e chimiche tendono a ridurre l'infezione minima residua e prospettano la possibilità di periodi "off therapy". Se il dosaggio della plasmaviremia ha rappresentato un ottimale marcatore per monitorare l'infezione e l'efficacia di terapia, le nuove conoscenze e le nuove strategie terapeutiche lo rendono insufficiente. È importante la messa a punto in sensibilità e riproducibilità di nuovi saggi molecolari che permettano di quantificare il DNA provirale integrato e episomale e gli mRNA virali intracellulari. Questi saggi dovrebbero inoltre riconoscere le diverse clade virali con la stessa efficienza.

S2.5

VACCINAZIONE ANTINFLUENZALE: STRATEGIE ATTUALI E PROSPETTIVE FUTURE

Donatelli I.

Per fronteggiare una eventuale nuova pandemia, le Sanità Pubbliche di tutto il mondo, in linea con quanto raccomandato dall'OMS, stanno predisponendo Piani strategici nazionali, finalizzati alla prevenzione o almeno al contenimento dei danni derivanti da una pandemia.

Una delle misure che risulterebbero particolarmente efficaci nella gestione di un evento pandemico è il rafforzamento dei sistemi di sorveglianza della malattia, sia in ambito veterinario che umano.

Tuttavia la misura più importante riguarda la messa a punto di vaccini pandemici cosiddetti *mock-up* (vaccino-prototipo), che utilizzano metodi di produzione alternativi a quelli comunemente impiegati, consistenti nell'uso di uova embrionale di pollo, quale substrato di crescita virale.

A questo proposito va ricordato che, se il ceppo pandemico fosse l'A/H5N1 o un altro virus altamente patogeno per le specie aviarie, non sarebbe possibile produrre un vaccino con le tecniche tradizionali, in quanto il virus ucciderebbe gli embrioni di pollo in cui dovrebbe essere coltivato. Per superare questo ostacolo oggi vengono utilizzate nuove tecniche di manipolazione genetica (*reverse genetics*), che permettono di costruire un prototipo vaccinale reso apatogeno e quindi coltivabile nelle uova embrionate.

relazioni

SESSIONE 3

Simposio intersocietario AMCLI-FADOI

Mercoledì 3 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, SALA BIANCA

PRIMA PARTE: LE POLMONITI NOSOCOMIALI

S3.1

EPIDEMIOLOGIA, EZIOLOGIA E DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

Farina C.

Le infezioni delle basse vie respiratorie costituiscono un'importante causa di morbosità e di mortalità, costituendo la sesta causa di morte nel mondo. La loro frequenza è favorita dalla modalità di trasmissione: la porta di ingresso è rappresentata soprattutto dalle prime vie aeree. Numerosi sono gli agenti eziologici in causa: negli ultimi anni, poi, si è assistito a significative modifiche nella frequenza di isolamento dei patogeni responsabili, certamente dovuta anche al perfezionamento dei metodi diagnostici, al riconoscimento di nuovi patogeni, all'aumento dei soggetti immunocompromessi ed anziani, all'incremento delle tecniche intensivistiche, nonché alle nuove strategie terapeutiche.

L'identificazione del microorganismo responsabile delle infezioni respiratorie attraverso le indagini colturali non è sempre facile, per la difficoltà ad ottenere materiale rappresentativo. Per tale motivo la massima attenzione deve essere posta in fase pre-analitica nella scelta della tecnica di prelievo: ove possibile, dovranno essere preferite tecniche di prelievo protette di materiale respiratorio proveniente da distretti basali (BAL, BAL mirato con cateterino, *brushing* endobronchiale protetto) rispetto alle tecniche di prelievo di materiali ad elevato rischio di contaminazione microbica con germi residenti nel cavo orale a livello salivare (espettorato, aspirato bronchiale, lavaggio bronchiale). Per questi ultimi è pertanto fondamentale procedere alla valutazione, preliminarmente al prosieguo delle indagini microbiologiche, dello score di qualità (*Q score*), al fine di accertare la significatività del campione. In ogni caso l'esame microscopico è di assoluta rilevanza, potendo i morfotipi evidenziati con le opportune colorazioni predire – in caso di prelievi pro-

tetti distali – l'esito dell'esame colturale. Questo dovrà essere effettuato ricorrendo a criteri interpretativi quantitativi, essendo state stabilite precise correlazioni tra le cariche critiche ottenute con la coltura dei liquidi di lavaggio e quella di frustoli biotici di tessuto polmonare. Il protocollo di indagini microbiologiche, infine, deve tenere conto di volta in volta delle caratteristiche cliniche ed epidemiologiche dei pazienti, non escludendo tuttavia l'effettuazione di un protocollo standard minimo di indagini.

S3.2

DIAGNOSI DIFFERENZIALE, TERAPIA E PREVENZIONE DELLE HAP

Giusti M.

Direttore S.C. di Medicina Interna A
- Ospedale San Giovanni Bosco di Torino

Si definisce polmonite nosocomiale (HAP) un'infezione delle basse vie respiratorie che si sviluppa dopo le prime 48 ore di ricovero in ospedale. Può essere associata alla ventilazione meccanica (VAP) o può colpire pazienti non ventilati, degenti nei reparti non di terapia intensiva.

La via di penetrazione dei germi patogeni è generalmente quella inalatoria, ma nei pazienti sottoposti ad interventi chirurgici o a manovre invasive è possibile anche la diffusione per via ematogena.

L'incidenza osservata è dell'ordine del 5-10 casi ogni 1.000 pazienti ricoverati, ma la frequenza aumenta di 6-20 volte nei pazienti ventilati meccanicamente.

Presso la Medicina Interna dell'Ospedale San Giovanni di Torino le infezioni delle basse vie respiratorie rappresentano globalmente il 16,2% dei ricoveri: 7,7% le riacutizzazioni di BPCO, 6,5% le polmoniti comunitarie (CAP), 1,1% le bronchiti acute, 0,8% le

polmoniti nosocomiali (HAP).

Il tasso di mortalità è alto e varia, secondo gli studi, tra il 30 ed il 70% dei casi.

Tra i fattori predisponenti endogeni meritano particolare attenzione l'età > di 65 anni, le comorbidità, la durata della degenza e le condizioni che alterano il meccanismo della deglutizione. Poiché i pazienti ricoverati in Medicina Interna sono nel 74% dei casi di età superiore ai 65 anni e nel 50% dei casi affetti da polipatologie importanti con necessità di degenza prolungata (il 30% dei ricoveri totali necessita di una degenza superiore alle 2 settimane), è facilmente comprensibile come il rischio di contrarre una polmonite nosocomiale sia tutt'altro che teorico.

La presentazione clinica è tanto più subdola quanto più anziano e polipatologico è il paziente. La tachipnea, l'alterazione dello stato di coscienza, il deterioramento dello stato generale con perdita dell'appetito e la comparsa di incontinenza sfinterica sono frequenti sintomi d'esordio che possono comportare un ritardo di terapia per la notevole difficoltà della diagnosi differenziale. In base all'epoca di insorgenza la HAP può essere ad esordio precoce (<5 giorni dal ricovero) o ad esordio tardivo (>5 giorni dal ricovero).

Tale distinzione è fondamentale ai fini della scelta della terapia antibiotica empirica poiché nelle forme ad esordio precoce l'eziologia è molto simile alle polmoniti comunitarie mentre nelle forme ad esordio tardivo sono frequentemente in causa germi particolarmente virulenti spesso con resistenza multipla agli antibiotici. La conoscenza dell'incidenza e delle caratteristiche delle infezioni nosocomiali sono presupposti imprescindibili per istituire adeguati programmi di prevenzione e controllo che permettano di monitorare localmente l'insorgenza di resistenze batteriche e indirizzare correttamente l'impiego degli antibiotici.

SECONDA PARTE: LE DIARREE DA ANTIBIOTICI

S3.4

LA DIARREA E COLITE DA ANTIBIOTICI: PROBLEMI DI DIAGNOSI E TERAPIA

Cipollini F.

UO medicina Interna

- Ospedale Amandola (AP), ASUR Marche Zona T. 13

Si definisce diarrea da antibiotici una condizione clinica caratterizzata dalla presenza di almeno tre scariche alvine di feci liquide per la quale sia stata esclusa ogni plausibile causa, che insorge durante o dopo 4 – 6 settimane di un trattamento antibiotico e che sia confermata da specifiche indagini di laboratorio.

La diagnostica di laboratorio si avvale del test di agglutinazione al lattice per la ricerca degli antigeni batterici e di indagini immunoenzimatiche finalizzate alla ricerca della tossina del *C. difficile*.

Quest'ultimo, a fronte di una minore sensibilità è dotato di una maggiore specificità. Particolarmente indaginosi e comunque non alla portata di tutti i laboratori sono l'indagine coproculturale e la ricerca della tossina B mediante valutazione dell'effetto citopatico su colture cellulari. Quest'ultimo è considerato il "gold standard" per la diagnosi di infezione.

Nei casi in cui il la tossina del *C. difficile* provoca un danno alla mucosa intestinale, l'endoscopia rappresenta un esame altamente sensibile e specifico: nei casi di colite da *C. difficile* la mucosa colica appare diffusamente iperemica ed edematosa e mostra delle pseudomembrane bianco-madreperlacee tenacemente adese (c.d. colite pseudomembranosa). La diagnosi differenziale è agevole con le gastroenteriti batteriche e virali (coprocultura, esami sierologici), le malattie infiammatorie croniche intestinali (clinica, endoscopia, laboratorio), colon irritabile (clinica). Qualche problema può sorgere con le diarree da antibiotici non correlate al *C. difficile* (ad esempio le diarree osmotiche da penicilline) che hanno, diversamente a quelle da *C. difficile*, un decorso clinico estremamente favorevole e non complicato.

Le complicanze quali il megacolon tossico e la perforazione, fortunatamente rare, interessano quasi esclusivamente soggetti di età avanzata affetti da altre importanti condizioni patologiche.

La terapia delle diarree/coliti da *C. difficile* consiste nel sospendere il trattamento antibiotico, ristabilire l'equilibrio idro-elettrolitico: non è indicato l'uso di farmaci antiperistaltici (es. loperamide).

La terapia antimicrobica specifica si avvale di due farmaci di prima scelta: il metronidazolo e la vancomicina. Entrambi risultano efficaci nella risoluzione clinica e batteriologica e sono caratterizzate da una percentuale di recidive post-terapia quasi sovrapponibili (4-13 %). Da qualche anno è stata proposta anche la teicoplanina, come terapia di seconda linea, che ha dimostrato una incidenza minore di recidive dopo la sospensione del trattamento.

Ma sicuramente un momento importante è costituito dalla prevenzione dell'infezione da *C. difficile* attuando tutte quelle misure idonee a ridurre il tasso di infezione: uso appropriato degli antibiotici, lavaggio accurato delle mani dopo ogni visita, isolamento enterico del paziente affetto, adeguata sanificazione e disinfezione delle degenze e strumentari ospedalieri e adeguata educazione di tutto il personale sulla epidemiologia e modalità di infezione.

relazioni

SESSIONE 4

Microbiologia clinica in geriatria

Giovedì 4 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

S4.1

IL PAZIENTE GERIATRICO TRA INFEZIONI ED ANTIBIOTICO TERAPIA

Gambassi G.

*Centro Medicina Invecchiamento,
Università Cattolica Sacro Cuore, Roma*

In Italia, 20% della popolazione ha oggi più di 65 anni. Questi soggetti assorbono quasi il 50% della spesa sanitaria globale, specie per le cure ospedaliere (50%) e la spesa farmaceutica (57%). Alcune caratteristiche collegate con il processo di invecchiamento come l'alterazione della funzione immunitaria favoriscono l'insorgenza di infezioni.

Queste hanno quadri clinici di presentazione che sono peculiari e spesso investono l'aspetto cognitivo.

Particolarmente vulnerabile è la popolazione di anziani che vive nelle residenze sanitarie.

Oggi, le malattie infettive sono la quinta-sesta causa di morte in questa popolazione.

L'uso dei farmaci antimicrobici - così come quello di tutte le classi - aumenta nelle fasce di popolazione più anziana.

Tra i 30 farmaci che contribuiscono maggiormente alla spesa farmaceutica ci sono 4 antibiotici e, globalmente la spesa per antimicrobici è seconda solo a quella per i farmaci cardiovascolari.

I pazienti anziani sono maggiormente esposti al rischio di prescrizioni inappropriate e a quello di reazioni avverse.

Dall'altra parte, misure di prevenzione e profilassi vengono spesso disattese in questa fascia di popolazione.

S4.3

LA GESTIONE INFETTIVOLOGICA NELL'ANZIANO

Tinelli M.

L'organizzazione attuale del nostro Servizio Sanitario Nazionale si fonda sull'integrazione dei servizi socio-assistenziali rivolgendosi alla persona/paziente, specie in età avanzata, sotto forma di offerta di servizi in "continuità assistenziale" la cosiddetta "*transitional care*" per gli anglosassoni.

L'attuale "sistema salute", a cui si rivolge il cittadino e l'anziano in particolare, è sempre più articolato attraverso molteplici offerte di prestazioni erogabili in un percorso di continuità assistenziale che coinvolge risorse strutturali, tecnologiche ed umane estremamente diversificate.

Con la crescita dell'età nella popolazione, aumenta nei paesi sviluppati anche il numero di anziani che risiedono in strutture di cura per lungodegenti (le cosiddette long term care facilities - LTCF nei paesi anglosassoni) e, nel contempo, pone l'anziano di fronte a molteplici situazioni di rischi ambientali a cui può andare incontro; viene di fatto favorita l'insorgenza delle infezioni la cui "responsabilità" va attribuita non solo ad una singola struttura ospedaliera ma, piuttosto, ad un sistema sanitario globalmente considerato.

La gestione clinica dell'anziano deve tenere conto di diversi fattori che lo diversificano dall'adulto: le manifestazioni cliniche di infezione possono presentarsi con degli evidenti classici sintomi clinici ma anche come sintomatologia clinica sfumata; esistono inoltre condizioni favorevoli persistenti e situazioni di cronicità aggravanti le stesse come le malattie degenerative collegate all'età (es. aterosclerosi, diabete, demenza, cancro, etc.) che aumentano collateralmente i rischi di infezioni. Le polmoniti, le sepsi, le infezioni della cute e dei tessuti molli (ulcere da decubito), le infezioni

delle vie urinarie, le diarree (*C. difficile*), il piede diabetico, la tubercolosi polmonare, le infezioni post-chirurgiche e le ectoparassitosi (scabbia) sono le malattie prevalenti che si riscontrano nelle strutture per anziani con una frequenza che raggiunge anche l'11% ed oltre secondo recenti lavori.

Inoltre, i residenti nelle LTCF sono spesso colonizzati da microrganismi antibiotico-resistenti come gli MRSA, i VRE, gli pneumococchi penicillino-resistenti, le ESBL, i gram negativi resistenti ai fluorochinoloni ed il *C. difficile*.

E pertanto fondamentale, nella gestione del rischio di infezione nell'anziano, intervenire sul cambiamento struttura/paziente attuando delle procedure di controllo, sorveglianza e prevenzione sia attiva che passiva limitando, nel contempo, la diffusione delle resistenze: in tal senso potrebbero essere utili i tests di screening al momento dell'accesso (tampone nasale per MRSA, urocultura, tampone rettale per ESBL) che permettono di mettere in atto misure di isolamento preventivo (da contatto, da coorte o strutturali).

Per quanto riguarda l'approccio terapeutico delle infezioni esso deve essere considerato secondo visione "globale" del problema tenendo conto dei diversi e complessi fattori che caratterizzano lo "status" relativo dell'anziano. La terapia antibiotica deve essere ritagliata nei confronti del singolo paziente avvalendosi sia delle linee guida internazionali ma soprattutto dell'epidemiologia locale fondamentale per un buon esito del trattamento.

In definitiva, il concetto classico di infezione è cambiato: nell'anziano e nella continuità assistenziale esso va correlato più in generale alle attività sanitarie e va sempre considerata la stratificazione del rischio di contrarre un'infezione al momento del ricovero o per trasferimento da un'altra struttura.

S4.4

LE STRATEGIE ORGANIZZATIVE NELLE STRUTTURE SANITARIE PER IL TRASFERIMENTO DEI PAZIENTI ANZIANI

Brusaferro S.

*Dipartimento di Patologia e Medicina Sperimentale e
Clinica - Università degli Studi di Udine*

L'articolazione dell'offerta clinico assistenziale e l'attenzione crescente da parte del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) ai percorsi clinico assistenziali oltre che l'evoluzione dei sistemi di accreditamento verso una valutazione costruita a partire dal percorso paziente rendono ragione del perché sia necessario adattare a questa realtà anche i sistemi di sorveglianza e controllo

lo delle infezioni correlate a pratiche assistenziali (ICPA).

In particolare questo è essenziale per il paziente anziano che sempre più nei suoi percorsi assistenziali, oltre alle strutture per acuti, ha una tappa obbligata nelle cosiddette Long Term Care Facilities (LTCF) che in Italia ricomprendono molteplici strutture, dalle residenze assistenziali (RSA) alle case di riposo per non autosufficienti, agli hospice, alle strutture di riabilitazione.

Il rischio di contrarre una ICPA è ben noto sia negli ospedali che nelle LTCF con una dimensione che in queste ultime varia se espressa in prevalenza tra il 2,4 ed il 32.7% e se espressa in incidenza tra il 2,6 ed il 9,5 infezioni per 1.000 giornate di degenza. Meno noti sono gli impatti (su se stessi, sugli altri degenti, sugli operatori) che pazienti infetti e/o colonizzati provocano nel trasferirsi da una struttura all'altra.

È anche rilevante ricordare come la tipologia più frequente di infezioni varia tra i diversi tipi di struttura ed a fronte delle infezioni del tratto urinario, delle infezioni delle ferite chirurgiche, del tratto respiratorio e del torrente ematico più presenti nelle strutture per acuti, nelle LTCF prevalgono quelle del tratto urinario, delle basse vie respiratorie, della cute e dei tessuti molli e del tratto gastrointestinale.

Un fenomeno di interesse emergente è la gestione dei pazienti infetti o colonizzati da particolari patogeni (es. MRSA, ESBL). Infatti a fronte di evidenze crescenti sulla circolazione di microrganismi resistenti agli antibiotici, le peculiari caratteristiche delle LTCF non sempre rendono facile utilizzare sistematicamente gli approcci raccomandati come l'utilizzo della diagnostica di laboratorio, l'adozione di procedure come il cohorting ecc. e molto spesso questo tipo di problematica ha scarso interesse nei protocolli di comunicazione tra i vari momenti assistenziali.

La sorveglianza e controllo delle ICPA e delle farmacoresistenze in Italia hanno ampi margini di miglioramento sia nelle strutture per acuti che nelle LTCF ma, rispetto al problema dei percorsi assistenziali, un punto sembra più essenziale degli altri ed è l'essere inseriti in una rete locale di sorveglianza e controllo (in genere facente capo all'ASL) capace di tracciare il rischio e rendere sinergiche le azioni lungo tutte le tappe del percorso paziente.

Dietro tutto questo c'è al sfida di garantire buoni standard di qualità e sicurezza al paziente (anche infetto e/o colonizzato) nelle varie fasi dell'assistenza.

S4.5

**CASO CLINICO:
COLITE DA CLOSTRIDIUM DIFFICILE****Frugoni S¹; Antoniotti N.²**¹ASP I.M.M.e.S.e P.A.T., Servizio di Medicina di Laboratorio,
Via Trivulzio 15, - 20146 Milano.²ASP I.M.M.e.S.e P.A.T., IV UOC Medicina Geriatrica,
Via Trivulzio 15, - 20146 Milano.

Clostridium difficile (*Cd*) è noto quale principale agente responsabile di diarrea, colite e colite pseudomembranosa associate a terapia antibiotica, soprattutto in ambiente ospedaliero.

Anche i chemioterapici e altri effetti multifattoriali sono in grado di alterare o danneggiare l'equilibrio naturale della flora intestinale, spianando la via alla colonizzazione da parte di *Clostridium difficile*.

Caratteristica di *Cd* è di dar luogo alla formazione di due tossine: un'enterotossina (tossina A) e una citotossina (tossina B) quasi sempre coesistente.

Tra i produttori di una singola tossina, predomina nettamente il gruppo di quelli che inducono la formazione della sola tossina B.

La presenza di recettori specifici "attivi" sembra essere condizione essenziale per il realizzarsi del quadro clinico.

Dopo il legame con un recettore specifico dell'orletto a spazzola, la tossina determina modificazioni del citoscheletro con successiva morte cellulare e rilascio dei mediatori dell'infiammazione e di citochine con attivazione della chemiotassi neutrofila e danno cellulare.

Istologicamente si rivelano necrosi cellulare, ulcerazioni e formazione di pseudomembrane.

I sintomi solitamente iniziano durante una terapia antibiotica, ma in 1/3 dei casi possono comparire da 1 a 10 giorni o più, dopo che il trattamento è stato sospeso.

Pertanto la diagnosi deve essere presa in considerazione fino a sei settimane dopo l'esposizione dell'antibiotico.

Le manifestazioni cliniche possono variare dalle semplici feci molli alla colite attiva con diarrea ematica, dolore addominale, febbre, leucocitosi ed enteropatia con perdita di proteine.

Nei casi più gravi, si può avere disidratazione, ipotensione, megacolon tossico e perforazione del colon.

La diagnosi si avvale di test specifici, del supporto radiologico ed endoscopico.

La terapia consiste nella sospensione di eventuale terapia antibiotica in atto e nella somministrazione di metronidazolo o vancomicina per os.

Metodi: La ricerca delle tossine è stata eseguita utilizzando i kit commerciali Triage *C.difficile* panel (BIOSITE) in grado di rilevare nelle feci la presenza di tossina A e dell'antigene di *Cd* e Toxins A & B (Meridian)

che rileva nelle feci ambedue le tossine.

L'esame colturale è stato eseguito a temperatura ed in atmosfera idonea utilizzando piastre al sangue (CD Agar BIOMERIEUX).

L'identificazione del microrganismo è stata eseguita utilizzando appropriate card del sistema automatico Vitek (BIOMERIEUX).

I campioni di feci pervenuti sono stati esaminati immediatamente.

Caso clinico: Donna di 79 anni, vedova con un figlio. Anamnesi fisiologica negativa

Anamnesi patologica remota: 1941 appendicectomia, 1999 diagnosi di ipertensione arteriosa, poliartrosi ed osteoporosi.

Anamnesi patologica prossima: 3/1/2006 caduta accidentale con conseguente frattura di femore destra ed intervento di osteosintesi.

Giunge alla nostra osservazione per trattamento riabilitativo.

La paziente all'ingresso era vigile, orientata nel tempo e nello spazio, in buone condizioni di nutrizione e sanificazione apparenti.

L'esame obiettivo capo, collo, cuore, torace e addome erano negativi. All'arto inferiore destro era presente edema della coscia e del ginocchio.

Non movimenti attivi per algia. Lesione da pressione di 2° al calcagno.

Esame obiettivo neurologico negativo.

Terapia all'ingresso: eparina a basso peso molecolare, ACE inibitore più diuretico.

18/1 urinocoltura positiva per *Pseudomonas aeruginosa*, trattata con **norfloxacin** per 7 giorni.

4/2 comparsa di febbre, diarrea (5-6 scariche di feci semiliquide), algie addominali in fianco sinistro, leucocitosi neutrofila, aumento della PCR (13.4mg/L)

Rx addome senza mezzo di contrasto (smdc): negativo

Idratazione ev più paracetamolo

Ricerca tossine e coltura *Cd*: **negativi**.

Permane diarrea.

11/2 viene eseguito un Rx con gastrografen che documenta alcuni livelli idroaerei, non ostacoli al mezzo di contrasto ed un'immagine a banda radiopaca che si proietta in corrispondenza del passaggio retto sigma, meritevole a giudizio del radiologo di controllo rettoscopico.

12/2 Rettoscopia: ulcerazioni multiple confluenti e abbondante essudato mucopurulento adeso alla mucosa.

In prima ipotesi rettocolite ulcerosa; si eseguono biopsie.

La paziente inizia terapia con mesalazina per os in attesa di ulteriori accertamenti

16/2 agli esami ematici, quadro malnutritivo, inizia prednisone ev 40 mg die.

Dopo due giorni miglioramento soggettivo e comparsa di feci semiformate.

18/2 Esame istologico: mucosa colica con focali accumuli superficiali di muco, fibrina, granulociti, associa-

ti a necrosi superficiale con flogosi granulocitaria.

Quadro suggestivo per colite pseudomembranosa.

Contemporaneamente il laboratorio di microbiologia comunica la **positività** su un **campione di feci fresche** per le tossine di *Cd*.

Progressivamente viene scalato lo steroide e si introduce terapia con vancomicina 500 mg x 4 per os. Per 10 giorni più probiotici.

1/3 Rettoscopia: netto miglioramento del quadro endoscopico.

Permane lieve iperemia della mucosa con qualche pseudomembrana a livello del sigma, all'esame istologico: edema della lamina propria che localmente appare sclerotica. Focali erosioni superficiali. Reperto suggestivo per lesione ischemica.

9/3 ricompare diarrea con scariche di feci liquide e febbre.

Ricerca tossine e coltura *Cd*: **negativi**

Permane diarrea e febbre.

19/3 Ricerca delle tossine ed esame colturale per *Cd*: **positiva**

La paziente viene trattata metronidazolo 250mg 2 cp x 3 per 10 giorni e viene trasfusa per grave anemia.

26/3 soggettivamente la paziente sta bene, non diarrea, obiettività addominale negativa, Rx addome smdc: negativo

Ricerca tossine e coltura *Cd*: **negativi**

Emotrasfusioni.

5/4 permane benessere, alvo regolare. La paziente riprende il percorso riabilitativo che continua fino a quando viene dimessa in discrete condizioni generali e autonoma nel cammino con l'ausilio di un canadese.

Al domicilio mesalazina e probiotici. che ha continuato per circa 12 mesi.

A tutt'oggi benessere soggettivo e obiettivo.

Non più episodi diarroici.

Considerazioni e conclusioni: Nonostante le manifestazioni cliniche suggestive per un'infezione da *Cd*, peraltro confermata dall'esame istologico dei prelievi biotici, la ricerca delle tossine e l'esame colturale, per ben due volte ed in tempi diversi, risultavano negativi. Questi risultati, in netto contrasto con il quadro clinico generale del paziente, sono stati valutati ed analizzati attentamente dal laboratorio di microbiologia.

Si sono potuti escludere errori analitici da parte del laboratorio di microbiologia ma non gli errori preanalitici dovuti ad una errata conservazione ed invio del campione in laboratorio.

In una successiva indagine con il personale del reparto è emerso che i due campioni "negativi" erano stati raccolti la sera precedente dell'invio del campione al laboratorio di microbiologia e conservati a temperatura ambiente.

Per evitare successivi gravi errori preanalitici come quello verificatosi che ha ritardato l'impostazione di una corretta ed efficace terapia, sono stati pianificati eventi formativi rivolti a tutto il personale dell'Ente.

S4.6

CASO CLINICO: ANZIANI E INFEZIONE DELLE VIE URINARIE

Balzaretti M.

ASP Golgi-Redaelli, Milano

Le vie urinarie sono la sede più frequente di infezione nel paziente anziano, in particolare nell'anziano degente in strutture protette quali RSA o Istituti di Riabilitazione. Per la diagnosi di infezione urinaria sintomatica vengono generalmente adottati i criteri CDC o i criteri di Mc Geer per la definizione e la sorveglianza delle infezioni nelle "long-term care facilities" (1,2)

I microrganismi isolati da coltura in pazienti anziani residenti in tali strutture sono caratterizzati da maggiore resistenza agli antibatterici rispetto ai ceppi isolati da anziani viventi in comunità. Le specie più frequentemente isolate sono *E.coli* e *P.mirabilis* e la prevalenza dei produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) varia sul territorio nazionale, anche se i dati raccolti si riferiscono prevalentemente a strutture del nord Italia.

Spesso tali ceppi producono ESBL di classe A, soprattutto di tipo CTX-M, ma sono in aumento gli isolati di *P.mirabilis* produttori di beta-lattamasi di classe C acquisite ed è stato segnalato il primo caso italiano di *P.mirabilis* produttore di una metallo beta-lattamasi di tipo VIM.

Diversi pazienti ricoverati in tali strutture, attraversando i nodi della rete, secondo i principi della continuità assistenziale, una volta tornati al domicilio possono diffondere resistenze, fino ad ora relegate alle strutture sanitarie o socio-sanitarie, anche in comunità. Ruolo cruciale acquista in tali strutture il laboratorio di microbiologia che deve essere in grado di segnalare tempestivamente e puntualmente al clinico i microrganismi con tali meccanismi di resistenza.

Di seguito si riporta il caso clinico che si discuterà nella sessione interattiva:

PP, di anni 73, ricoverato per esiti di frattura femore nel maggio 2007 presso il reparto di Riabilitazione Specialistica dell'Istituto Geriatrico P.Reddaelli di Milano, proveniente dalla divisione di Ortopedia di un ospedale milanese. All'ingresso il paziente presenta moderato deficit cognitivo, stato nutrizionale compromesso, sindrome da allettamento, ulcere da decubito in regione sacrale, diarrea. Il pz è portatore di catetere a dimora da 20gg, dal momento cioè del ricovero ospedaliero. Esami ematochimici all'ingresso: GB 10,5 con 85% di neutrofili, PCR 280 mg/L, tossina A del *C.difficile* positiva. L'urina ha pH alcalino; all'esame microscopico del sedimento si rileva la presenza di flora batterica e leucociti. Presenta un lieve rialzo termico (37.5°C) non segnalato alla dimissione ospedaliera e stato di agitazione.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Mc Geer A et al: Definition of infection for surveillance in long term care facilities. *Am J Infect Control* 19(1): 1-7, 1991
- 2) Infection control guidelines for long term care facilities. Missouri Department of Health and Senior Service, 2005

relazioni

SESSIONE 5

Infezioni virali latenti, persistenti e croniche

Giovedì 4 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, SALA BLU

S5.1

INFEZIONI PERSISTENTI DA PARVOVIRUS B19

Azzi A, Zakrzewska K., Cornioli F.

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Laboratorio di Virologia
Oretta Bartolomei Corsi, Università di Firenze*

Il parvovirus B19 costituisce la specie tipo del genere *Erythrovirus*, nella *Famiglia Parvoviridae*. All'interno della specie si distinguono, attualmente, 3 genotipi, le cui sequenze nucleotidiche presentano una divergenza attorno al 10%. Il genotipo più noto e più studiato è il genotipo 1, che comprende il classico B19 e ceppi simili al B19. Il genotipo 2 comprende i ceppi LaLi e A6 e ceppi ad essi correlati, mentre il genotipo 3 comprende il ceppo V9 e ceppi ad esso correlati. L'infezione acuta da parvovirus B19 è causa dell'Eritema Infettivo, di artralgie, di crisi aplastica transitoria in soggetti con anemia emolitica congenita; inoltre, l'infezione contratta in gravidanza può essere trasmessa al feto e può causare aborto o idrope fetale. Più raramente l'infezione acuta da parvovirus è stata associata a encefalite, a miocardite, a epatite. I progenitori eritroidi midollari sono le principali cellule bersaglio dell'infezione, permissive per la replicazione virale. Da qui trae origine la consistente viremia che caratterizza l'infezione acuta, prima dell'intervento della risposta immunitaria. La persistenza del virus, con conseguente sviluppo di anemia cronica, è stata dimostrata in pazienti immunodepressi, per l'incapacità di risolvere spontaneamente l'infezione, in assenza di una risposta immunitaria adeguata. In questo tipo di infezioni, la viremia è solitamente bassa e può avere un andamento intermittente. In questi casi, la somministrazione di IVIG è, ancora oggi, l'unico approccio terapeutico praticabile. È ormai noto, tuttavia, che il parvovirus B19 può persistere

anche in individui immunocompetenti. In questi casi la viremia è generalmente assente, mentre il virus, o almeno il suo genoma, è presente in alcuni tessuti. Sedi di persistenza del virus, finora individuate, sono cute, sinovia, fegato, miocardio e lo stesso midollo osseo. Nel tentativo di individuare in quali cellule il virus possa persistere, sono stati sviluppati alcuni modelli di infezione in vitro, quali colture primarie di fibroblasti cutanei e di cellule endoteliali umane. In che forma il virus persista nei soggetti immunocompetenti e quali siano le possibili conseguenze della persistenza virale sono aspetti non ancora risolti. Alcuni studi consentono di ipotizzare che infezioni persistenti da parvovirus possano essere implicate nello sviluppo o nell'esacerbazione di alcune malattie autoimmuni, quali, tra l'altro, l'artrite reumatoide e la sclerodermia. A questo proposito, tuttavia, i dati della letteratura sono discordanti. La documentata presenza di sequenze virali in diversi tessuti, in soggetti "sani", indica comunque che la presenza del genoma virale a livello dei tessuti non ha, di per se, valore diagnostico. Occorrono quindi ampi ed approfonditi studi per chiarire il ruolo patogenetico delle infezioni persistenti da parvovirus B19 e, più in particolare, delle infezioni causate dai tre diversi genotipi.

S5.2

INFEZIONI LATENTI E PERSISTENTI DA HERPESVIRUS UMANO 6

Di Luca D.

Università degli Studi, Ferrara

L'herpesvirus umano 6 è un virus ubiquitario, e l'infezione primaria, che avviene entro i primi anni di vita, è associata a "Sesta Malattia" e a sindromi febbrili senza esantema e di breve durata, ma può anche essere asintomatica. Il virus si presenta in due varianti, facilmente differenziabili a livello molecolare, che sembrano avere anche differenze patogenetiche. Il virus persiste nell'organismo stabilendo una infezione latente, soprattutto in linfociti e macrofagi, ma sequenze virali vengono rinvenute praticamente in tutti i tipi cellulari ed in molti organi, in quanto il recettore riconosciuto dal virus è la molecola CD46, espressa comunemente. Il virus è in grado di riattivarsi dalla latenza, soprattutto in condizioni di immunosoppressione, e nei trapiantati la riattivazione virale è associata a rigetto dell'organo, a gravi malattie (polmoniti, encefaliti).

Inoltre, la riattivazione di HHV-6 è spesso associata alla riattivazione di HCMV, con tutte le rilevanti conseguenze patologiche.

Inoltre, la presenza di IgM specifiche in circa il 5% di adulti sani suggerisce che spesso si verifica riattivazione asintomatica.

I meccanismi molecolari della latenza virale devono ancora essere chiariti, ma un ruolo importante sembra essere svolto da uno specifico gene, denominato U94. Oltre ad infezioni latenti, HHV-6 stabilisce anche infezioni croniche, associate a bassa produzione di particelle virali, come ad esempio avviene nelle ghiandole salivari, infatti molti soggetti sani, completamente asintomatici, rilasciano piccole quantità di virus infettate tramite la saliva.

La diagnosi di infezione attiva è difficile, a causa della prevalenza dell'infezione, della persistenza di sequenze virali anche in cellule non considerate essere bersaglio patogenetico, e dalla difficoltà di discriminare fra semplice presenza virale (latenza) ed infezione produttiva.

Un esempio di tale difficoltà è rappresentato dall'associazione fra HHV-6 e Sclerosi Multipla, che a distanza di anni da quando è stata proposta, è ancora dibattuta ed incerta, anche se recenti evidenze suggeriscono che in alcuni pazienti il virus possa stabilire infezioni croniche, prevalentemente nel sistema nervoso centrale.

S5.3

LA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI CITOMEGALOVIRUS UMANO IN MODELLI DI INFEZIONE LATENTE IN VITRO

Arcangeletti M.C.

Sezione di Microbiologia. Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio. Università degli Studi di Parma.

Le cellule mononucleate del sangue periferico sono indicate come uno dei probabili siti di latenza del virus citomegalico umano (HCMV).

In questo studio, la linea cellulare monocitaria THP-1 è stata impiegata come modello di infezione latente da HCMV (stipite Towne).

L'induzione del differenziamento mediante trattamento con un estere del forbolo (12-*O*-tetradecanoilforbolo-13-acetato) rende le cellule THP-1 permissive all'infezione da HCMV (modello di infezione litica). I suddetti sistemi sperimentali, latente e litico, sono stati utilizzati per studiare se meccanismi epigenetici di regolazione dei geni cellulari, quali specifiche modificazioni degli istoni, potessero essere coinvolti anche nella regolazione dell'espressione genica di HCMV. Allo scopo, mediante l'applicazione di un protocollo di immunoprecipitazione della cromatina, realizzato con l'ausilio di anticorpi in grado di riconoscere l'istone H3 acetilato o dimetilato a livello di lisina in posizione 9 (K9), è stato dimostrato che in cellule THP-1 non differenziate ed infettate con lo stipite virale Towne (infezione latente), l'*enhancer* dei geni precocissimi di HCMV non sembra essere significativamente associato alla forma acetilata o dimetilata dell'istone H3. Per quanto riguarda l'analisi relativa ai geni di HCMV codificanti per le proteine virali DNA polimerasi, pp65 e pp150, essi sono associati prevalentemente alla forma acetilata in K9 dell'istone H3 nel modello di infezione litica (cellule THP-1 differenziate), mentre durante l'infezione latente è stata osservata un'associazione significativa alla forma dimetilata dello stesso istone.

Questi dati suggeriscono che la metilazione dell'istone H3 in posizione K9 sia coinvolta nella repressione genica di HCMV; al contrario, l'associazione dei geni virali con H3 acetilato è verosimilmente necessaria per l'attività trascrizionale. È plausibile supporre che gli stessi tipi di modificazioni istoniche siano utilizzati per marcare i geni attivi o repressi sia nell'ambito della cromatina cellulare, sia nel genoma di HCMV.

S5.4

MECCANISMI PATOGENETICI DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA ACQUISITA

Re M.C.

Sezione di Microbiologia,
Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale
Università degli Studi di Bologna

I pazienti HIV-1 sieropositivi presentano, nell'evoluzione della loro malattia, l'interessamento non solo dei linfociti e dei monociti, che rappresentano il bersaglio replicativo del virus, ma anche la degenerazione o l'inibizione della sopravvivenza/proliferazione di cellule nervose e di progenitori ematopoietici che determinano la comparsa di citopenie addizionali con una peggiore prognosi della malattia. Un aspetto patogenetico di grande importanza, segnalato clinicamente sin dagli anni '90, riguarda la comparsa di lesioni di tipo osteopenico/osteoporotico nei pazienti HIV-1 positivi. Queste lesioni inusuali per l'età e per l'assetto ormonale specifico per il metabolismo osseo dei pazienti stessi, rappresentano un problema sempre più importante nella gestione del paziente HIV-1 positivo in quanto questi quadri clinici a carico della struttura ossea sono diventati sempre più comuni in seguito all'applicazione corrente della terapia antiretrovirale a più farmaci (HAART). Tale trattamento ha permesso di contrastare efficacemente la malattia HIV-1 indotta rallentandone la progressione verso gli stadi terminali ma ha portato a tutta una serie di effetti collaterali tra cui l'osteopenia/osteoporosi gioca un ruolo fondamentale. La comparsa di osteopenia e di quadri osteoporotici in pazienti HIV-1 sieropositivi rappresenta un aspetto patogenetico emergente che viene osservato in campo clinico in un numero sempre più consistente di pazienti con conseguenti problematiche nella gestione clinica e terapeutica dei pazienti stessi. Il tessuto osseo è regolato dall'azione opposta degli osteoblasti e osteoclasti che tramite meccanismi di produzione e di riassorbimento osseo regolano di fatto la omeostasi ossea. Recenti studi hanno dimostrato che, un ruolo molto importante sul tessuto osseo è svolto dall'azione di alcune citochine come RANKL, OPG e TRAIL che con differenti modalità intervengono nella regolazione della struttura ossea. L'alterazione dei livelli di queste citochine nei pazienti HIV infetti con riduzione patologica della struttura ossea, avvalorate da recenti studi condotti dal nostro gruppo di ricerca, potrebbero rappresentare un meccanismo operativo *in vivo* in grado di indurre il progressivo deterioramento della struttura ossea osservabile nel corso di infezione.

S5.5

HCV: DALL'INFEZIONE ALLA CRONICIZZAZIONE

Crovatto M., Mucignat G., Gava G., Da Re A.,
Giani G.

Struttura Operativa Semplice Dipartimentale
Dipartimento di Medicina di Laboratorio
Azienda Ospedaliera "Santa Maria degli Angeli"
Pordenone

HCV è uno dei maggiori responsabili di epatite cronica, cirrosi ed epatocarcinoma ed è coinvolto anche in una numerosa serie di manifestazioni extraepatiche quali la crioglobulinemia mista, disordini linfoproliferativi, manifestazioni dermatologiche, endocrinologiche e reumatologiche. L'elevata tendenza alla cronicizzazione (>80%) e lo sviluppo polimorfo della malattia indicano che HCV ha sviluppato strategie complesse per antagonizzare ed evadere la risposta immunitaria dell'ospite, per resistere all'azione antivirale degli interferoni e per persistere nell'organismo infettato. I meccanismi proposti per spiegare questa abilità sono molti e vedono implicati da un lato le sue caratteristiche peculiari quali l'elevata possibilità di mutazione e la capacità di influenzare i subsets di cellule T durante la fase acuta dell'infezione, dall'altro le caratteristiche intrinseche del soggetto. La reale dinamica a lungo termine dell'infezione e le tappe del percorso che conducono alla cronicizzazione in realtà sono tutt'ora poco chiare a partire dalle primissime fasi dell'infezione in cui avviene l'interazione con uno o più recettori specifici. HCV è presente in diverse forme circolanti nel soggetto infetto: particelle virali legate a lipoproteine (sono quelle dotate di maggiore infettività) e libere, dotate di envelope e non dotate di envelope e queste diverse forme sembra possano utilizzare recettori diversi per aderire e penetrare nella cellula.

CD81 (tetraspanina), SR-BI (scavenger receptor di classe B, tipo 1), lectine di tipo C (DC-SIGN, L-SIGN, asialoglioproteine, LDL (low-density lipoprotein receptor), glicosaminoglicani sono stati proposti quali recettori. Un ruolo determinante, per quanto riguarda il virus, è rivestito dalle proteine dell'envelope E1 ed E2. Molti pezzi del mosaico che costituisce il meccanismo di entrata nella cellula sono stati identificati, rimane ancora da chiarire come i pezzi si combinano tra loro. L'ipotesi dell'utilizzo di recettori diversi, da parte delle diverse forme è supportata dal sequenziamento del genoma virale di particelle isolate da tessuti diversi: ad esempio cambi negli aminoacidi dell'estremità N-terminale di E2 si hanno più frequentemente in virioni isolati da plasma e fegato che nei virioni associati a lipoproteine presenti nel plasma che verosimilmente, grazie proprio al rivestimento, vengono sottratti alla

pressione del sistema immunitario.

Le varie ipotesi relative ai meccanismi di entrata del virus nella cellula ed ai meccanismi di consolidamento della sua presenza con conseguente persistenza ed evoluzione dell'infezione verso la cronicizzazione, verranno discussi alla luce delle acquisizioni più recenti.

CD81: membro della famiglia delle tetraspanine

- 4 domini transmembrana
 - corti domini intracellulari
 - 2 loops extracellulari:
 - SEL (small extracellular loop)
 - LEL (large extracellular loop): contiene motivi caratteristici, in particolare CCG (cisteina-cisteina-glicina) coinvolti nella formazione di legami disolfuro
- LEL: 2 sottodomini
- Sottodominio conservato di 3 eliche (blu)
 - Sottodominio variabile di 2 eliche che si inserisce sul dominio conservato (rosse)

ARCHITETTURA DEL RECETTORE:

Le tetraspanine formano associazioni laterali con diversi tipi di molecole (P) ed anche tra di loro (T) per formare complessi multimolecolari definiti "TETRASPANIN WEBS"

SR-BI o Scavenger Receptor class B type I

Glicoproteina di superficie di 509 aa, espressa in molti tessuti dei mammiferi e tipi cellulari ma soprattutto nel fegato, surrenali ed ovaio. Si lega a LDL (lipoproteine acetilate e bassa densità) e HDL (lipoproteine ad alta densità). È un multiligando

- 2 corti domini citoplasmatici
- 2 domini transmembrana

SR-BI umano: contiene 9 potenziali siti di N-glicosilazione e 6 cisteine

Interazione con sE2 specifica, ma non diretta (secondo i dati ottenuti "in vitro")

L'interazione con il recettore sembra avvenga a livello di HVR-1 (*modula verosimilmente l'infettività*) di HCV aiutando l'interazione E2-SR-BI direttamente o indirettamente

LECTINE DI TIPO C

DC-SIGN: recettore di adesione per stabilire le interazioni cellulari tra cellule dendritiche e cellule T o cellule endoteliali. E' anche un recettore per l'antigene che internalizza dopo il legame in modo da veicolare l'antigene al compartimento endosoma/lisosoma per la presentazione alle cellule T. *E' espressa sulle cellule dendritiche*

L-SIGN: stabilisce le interazioni cellulari con le cellule T. E' espressa sulle cellule endoteliali sinusoidali nel fegato e nei linfonodi

Sia DC-SIGN che L-SIGN riconoscono strutture di carboidrati sui patogeni

HCV si lega alle cellule che esprimono DC-SIGN ed L-SIGN che però non sono presenti sugli epatociti, per cui sicuramente non costituiscono il recettore per que-

ste cellule. Potrebbero contribuire all'attaccamento o alla persistenza dell'infezione sia "catturando" e riversando particelle virali nel fegato sia modulando le funzioni delle cellule dendritiche

ASIALOGLICOPROTEINE: lectina di tipo C comunemente presente nel fegato. Da determinare il reale ruolo nella penetrazione di HCV nella cellula

RECETTORE LDL (Low-Density Lipoproteins)

Media l'internalizzazione di HCV legandosi alle particelle LDL associate al virione. Ruolo da confermare

GLICOSAMINOGLICANI

Le catene di glicosaminoglicani sui proteoglicani della superficie cellulare forniscono i siti per il legame di diversi virus alle cellule. Nel caso di HCV il legame tra la proteina E2 ed eparan solfato possa servire quale sito di attacco iniziale a cui segue il trasferimento ad un secondo recettore ad alta affinità. Non tutti gli studi confermano questo dato, per cui il problema resta ancora da chiarire.

- CD81 è essenziale per l'ingresso di HCV nella cellula
- Non noto l'esatto ruolo di SR-BI, sembra però intervenga nel modulare l'entrata
- Non è chiaro a quale stadio dell'entrata viene richiesto SR-BI
- SR-BI internalizza alcuni dei suoi ligandi, per cui potrebbe essere in grado di trafficare virioni di HCV a compartimenti a pH inferiore dove può avvenire la fusione di HCV
- SR-BI modula la composizione della membrana cellulare per cui potrebbe permettere l'entrata di HCV tramite modulazione della componente lipidica
- L'espressione di CD81 ed SR-BI su cellule non epatiche non permette l'ingresso di HCV e questo dimostra che sono necessarie molecole aggiuntive, espresse solo a livello della cellula epatica

relazioni

SESSIONE 6

Technology assessment in microbiologia

Giovedì 4 ottobre 2007, ore 09.00 - 11.00, SALA BIANCA

S6.1

ASSESSING TECHNOLOGY AND METHODOLOGY IN CLINICAL AND PUBLIC HEALTH MICROBIOLOGY LABORATORIES IN THE UK

Bevani, V.

Evaluations and Standards Laboratory, Centre for Infections, Health Protection Agency, London, NW9 5EQ, United Kingdom.

Microbiology / virology laboratories in the UK respond to a number of drivers to assure the quality of the work undertaken. Within an overall quality assurance framework, the Health Protection Agency (HPA) assumes a leadership and influencing role in clinical diagnostic and public health laboratories. The talk will describe how the Evaluations and Standards Laboratory (ESL) provides a service to labs in the UK and more widely in Europe and globally on many aspects of quality, focussing on three aspects: the development of national standard methods, assessment of medical and other healthcare related devices, and the use of internal quality control programmes for virology / serology. National Standard Methods, comprising standard operating procedures (mainly for bacteriology), clinical testing algorithms (mainly for virology / serology), overarching syndromic algorithms, and guidance notes are designed to guide clinical diagnostic microbiology and public health laboratories in their laboratory testing regimes. The collection of over 200 National Standard Methods have been drawn up under the curatorship of the HPA over the last ten years by multi professional working groups from professional organizations and laboratory networks from throughout the UK. National Standard Methods are well referenced, regularly updated and represent a good minimum standard for laboratories to comply with; they also help with complying with accreditation requirements. The documents undergo wide consultation with >1000 password holders worldwide and are freely available via the Internet www.evaluations-standards.org.uk. We have a close rela-

tionship with AMCLI and the methods have been translated into Italian and are freely accessible via the Italtbioforma website <http://fad.italbioforma.it/P5.asp>.

The presentation will also describe how the HPA-Microbiological Diagnostics Assessment Service assesses the performance of microbiological *in vitro* diagnostic devices (IVDDs) and associated equipment used to diagnose and manage infection. The UK approach to evaluating medical devices will be described including some of the issues and dilemmas currently facing microbiology / virology in the UK. Another of our remits is developing quality control programmes and supplying quality control reagents to help laboratories monitor the performance of their kits and equipment. The benefits of such a system will be presented, highlighting some interesting findings showing the value of the monitoring.

S6.2

IL PROCESSO DI VALUTAZIONE DELLE TECNOLOGIE SANITARIE

Lauria F.N.

Ist. Naz. per le Malattie Infettive "L. Spallanzani" Roma

Introduzione. L'evoluzione tecnologica e la crescente complessità dei trattamenti sanitari utilizzati impone la necessità di attuare un sistematico processo di valutazione prima di introdurre una tecnologia nella pratica clinica corrente, considerando le diverse esigenze tecniche, organizzative, di efficacia e di efficienza. Gli esami diagnostici rappresentano la logica estensione dell'esame clinico del paziente: l'uso delle informazioni che derivano da un esame diagnostico è quello di confermare o meno un sospetto clinico ovvero di discriminare tra due diagnosi. Infatti, una prestazione diagnostica è di solito richiesta per: confermare o respingere una ipotesi diagnostica; fornire informazioni circa l'eziologia di una determinata patologia; indicare la presenza di complicanze comprese quelle indotte dalla terapia; fornire informazioni sulla prognosi; monitorare la risposta al trattamento; diagnosticare una patologia nella fase

preclinica (*screening*).

Le caratteristiche del processo di Technology Assessment

Gli ambiti presi in considerazione da un processo di valutazione delle tecnologie sanitarie sono numerosi e riguardano fattori quali l'efficacia attesa, l'efficacia nella pratica clinica, l'utilità clinica di un test diagnostico, le sue caratteristiche tecniche e di sicurezza, la sua applicabilità, i costi e i vantaggi di scelte terapeutiche che ne derivano. Nell'esaminare ed analizzare la letteratura in relazione alla decisione di introdurre, ad esempio, un nuovo test diagnostico nella pratica clinica, è necessario verificare l'esistenza di tre requisiti fondamentali:

- 1) la validità dei risultati degli studi esaminati;
- 2) le caratteristiche di questi risultati;
- 3) la loro trasferibilità o utilizzo nella propria pratica clinica. In questa prospettiva, le tecnologie che assumono particolare importanza ai fini del processo di valutazione, sono riconducibili a due gruppi:

- 1) tecnologie a "basso costo" (in relazione alla loro diffusa utilizzazione e soprattutto al loro abuso nella pratica clinica),
- 2) Tecnologie cosiddette emergenti.

Un esempio può essere rappresentato dalla recente diffusione delle tecniche di biologia molecolare e del loro utilizzo nella pratica clinica, soprattutto in diagnostica microbiologica. Le caratteristiche di queste tecnologie configurano la necessità di definire criteri di appropriatezza sia della fase analitica (scelta della tecnica utilizzata da parte dei diversi laboratori), che della fase pre-analitica (appropriatezza della richiesta), che della fase post-analitica (appropriatezza del referto), finalizzata ad una corretta applicazione clinica, spesso non riscontrata nelle scelte di clinici e patologi clinici.

Le diverse tipologie di technology assessment (TA).

Un processo di valutazione di tecnologia sanitaria ha sempre e comunque tre aspetti: un aspetto tecnologico ("*technology oriented*"), un aspetto orientato ad un determinato programma o progetto ("*project oriented*") e un aspetto orientato ad un problema ("*problem oriented*").

Una procedura di valutazione accreditata (National Information Center on Health Services Research and Health Care Technology -NICHSR; NIH) identifica 6 livelli di valutazione nel processo di Technology Assessment (TA) relativo ad un procedura diagnostica:

Livello 1: qualità tecnica

Livello 2: accuratezza diagnostica, sensibilità e specificità

Livello 3: cambiamenti indotti nel comportamento clinico

Livello 4: effetti sul profilo assistenziale

Livello 5: effetti sull' "*outcome*" del paziente

Livello 6: costi complessivi

In base a questa metodologia, la valutazione di una tecnologia diagnostica è effettuata secondo una scala gerarchica coerente che parte dagli aspetti di qualità tecnica, passa attraverso i cambiamenti indotti nel comportamento clinico rispetto all'uso di quella pratica diagnostica fino ai costi che ne derivano. I primi due livelli identificano un processo di *TA-technology oriented*, mentre i livelli successivi sono correlabili complessivamente ad un processo di valutazione *project-oriented*, il livello 3 e 4 è relativo ad un processo di valutazione

problem-oriented. Pertanto, un esempio di *TA-technology oriented* può essere costituito da una valutazione degli studi di accuratezza diagnostica. Un processo *TA-project-oriented*: si caratterizza, invece, per essere orientato a valutare l'adozione di una nuova tecnologia e/o la sostituzione di una metodica precedentemente utilizzata, seguendo una metodologia di valutazione e una procedura organizzativa di adozione. Una valutazione di *TA-problem-oriented*: consiste nell'esaminare i problemi e le conseguenze derivanti da un costante utilizzo nella pratica clinica di una determinata tecnologia diagnostica.

Conclusioni. È evidente che l'introduzione di una sistematica valutazione delle tecnologie sanitarie nei diversi contesti clinici ed assistenziali è opportuna e necessaria, in quanto consente di orientare e qualificare il processo diagnostico e terapeutico, anche in relazione alle risorse disponibili. È altresì evidente che i processi di valutazione 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, i limiti temporali, i limiti organizzativi.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Sox H., Stern S, Owens D, Abrams HL. Assessment of diagnostic technology in Health Care-Rationale for assessment diagnostic technology. *National Academy Press. Washington DC 1989; pag 8-22.*
 - 2) Fryback DG, Thourbury JR: The efficacy of the diagnostic imaging *MedDecis Making 1991; 11(2):88-94*
 - 3) Battista RN: la valutazione delle tecnologie sanitarie *Epid Prev 1994;18:15-21.*
 - 4) Jaeschke R, Guyatt G, Sackett D: User's Guides to the Medical Literature How to Use an Article About a Diagnostic Test *JAMA 1994;271(9): 703-7*
 - 5) Jenkins SG: Evaluation of new technology in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis 1995 ;23(1-2): 53-60*
 - 6) Begg C, Cho M, Eastwood S, Horton R, Moher D, Olkin I, et al. Improving the quality of reporting of randomized controlled trials. The CONSORT statement. *JAMA 1996;276:637-9.*
 - 7) Moher D, Jones A, Lepage L. Use of the CONSORT statement and quality of reports of randomized trials. A comparative before-and-after evaluation. *JAMA 2001;285:1992-1995.*
 - 8) Sackett DJ et al. The architecture of diagnostic research. *BMJ 2002; 324: 539-41*
 - 9) Lauria F.N.: Il processo di valutazione delle tecnologie utilizzate nel laboratorio di microbiologia: metodologie e criteri di riferimento. *Analysis 2003; 1: 84-108*
 - 10) Bossuyt P M et al. for the STARD Group* Towards Complete and Accurate Reporting of Studies of Diagnostic Accuracy: The STARD Initiative *Ann Intern Med. 2003;138:40-44.*
- The STARD Group. Towards complete and accurate reporting of studies on diagnostic accuracy: the STARD initiative
<http://www.consort-statement.org/stardstatement.htm>

relazioni

SESSIONE 7

Il progetto di ricerca ASSR per il piano nazionale della microbiologia clinica

Giovedì 4 ottobre 2007, ore 11.15 - 13.00, SALA BIANCA

S7.1

L'EVOLUZIONE DEL PROGRAMMA DI RICERCA

Spanò A.

Il Piano Nazionale per la Microbiologia Clinica dovrà configurarsi come uno strumento per la Programmazione Sanitaria. Per tale finalità è in corso dalla fine del 2006 il Progetto di ricerca sanitaria ASSR "Modelli di gestione integrata delle malattie infettive e della diagnosi microbiologica nella continuità ospedale-territorio". Il progetto intende valutare l'impatto della microbiologia clinica sulla diagnostica in generale e sulle malattie infettive in particolare, e definire modelli di gestione delle patologie infettive attraverso percorsi assistenziali che integrino l'operatività dei servizi di diagnostica microbiologica in una logica di continuità ospedale-territorio. Il progetto intende altresì identificare i livelli di complessità organizzativa, correlati ai processi fondamentali che caratterizzano la diagnostica microbiologica, delineando modelli di organizzazione utili alla programmazione sanitaria. Si tratta anche di definire una Rete ospedale-territorio funzionale al miglioramento della fruibilità delle prestazioni da parte di pazienti e medici, alla riduzione dei ricoveri ospedalieri, alla razionalizzazione dell'uso degli antibiotici. A tal fine saranno messi a punto criteri e metodi per classificare le prestazioni di microbiologia correlate ai diversi processi assistenziali integrati, indicatori di processo in grado di misurare la complessità organizzativa ed il livello specialistico del laboratorio di microbiologia coinvolto nel processo diagnostico-terapeutico, l'esistenza di particolari profili di cura o percorsi diagnostici correlati a singole patologie infettive e/o gruppi omogenei di pazienti. Attualmente è in corso una indagine preliminare finalizzata ad identificare i servizi di microbiologia secondo criteri di complessità tecnologica ed organizzativa e

grado impegno assistenziale, e ad elaborare un modello di integrazione in rete dei servizi stessi, in una logica di continuità ospedale-territorio secondo criteri di eccellenza clinica. Sarà effettuata una analisi comparativa delle informazioni raccolte, una valutazione qualitativa dei servizi di microbiologia clinica e la verifica dell'applicabilità degli indicatori individuati, per la definizione del modello organizzativo ottimale delle reti regionali dei servizi di microbiologia. Nell'attuale fase della ricerca è stato somministrato ai laboratori pubblici e privati, generalisti e specializzati in microbiologia, un questionario orientato a rilevare per ogni servizio di laboratorio del territorio di competenza, informazioni relative all'organizzazione delle attività (Struttura e tipologia dei Servizi coinvolti), alle caratteristiche della diagnostica rilevata e volumi di attività, alle relazioni con i medici curanti ed i pazienti. I dati forniti saranno resi anonimi ai fini dell'elaborazione per le esclusive finalità della ricerca. Il progetto, nella seconda fase, si propone di rendere trasferibili i risultati della ricerca alla programmazione regionale come strumento fondamentale di supporto per la redazione dei Piani Sanitari Regionali, e per riassumere un ruolo centrale e specifico allo Specialista Microbiologo Clinico nel processo diagnostico di cui deve essere autentico protagonista.

S7.2

LO STATO DEL PROGRAMMA DI LAVORO AMCLI: “PERCORSI DIAGNOSTICI IN MICROBIOLOGIA”

Goglio A.*, per il GL Amcli Nomenclatore e percorsi diagnostici (S. Andreoni, F. Bernieri, M.R. Capobianchi, M. Crovatto, C. Farina, G. Gesu, A. Goglio, E. Magliano, P. Nicoletti, A. Spanò)

* US Microbiologia e Virologia, AO Ospedali Riuniti, Largo Barozzi 1, Bergamo

L'idea di produrre “percorsi diagnostici in microbiologia” non è recente. Nasce nel 2004, quando viene istituito un gruppo di lavoro dell'Amcli (GL) per l'aggiornamento del Nomenclatore/Tariffario Nazionale (D.M. 22.7.96 n°150), strumento indispensabile, e certamente utile, per valorizzare da un punto di vista economico l'attività dei laboratori, ma del tutto insufficiente a rappresentare i contenuti della richiesta clinica. Di conseguenza ogni laboratorio di microbiologia si è visto costretto a produrre un suo nomenclatore (repertori delle richieste) che facesse da ponte tra la richiesta del medico (un quesito clinico mirato ad ottenere una risposta utile per il malato) e le definizioni contenute nel Nomenclatore/Tariffario.

Conclusa la proposta di aggiornamento del Nomenclatore/Tariffario il GL si è dato allora due obiettivi:

- Definire un elenco nazionale delle prestazioni di microbiologia che possa essere utilizzato dal clinico per inviare al microbiologo, in modo appropriato e non equivoco, la richiesta diagnostica.
- Definire il contenuto di ciascuna voce che deve essere chiaramente esplicitato, omogeneo ed unico nei diversi laboratori, noto al microbiologo ed al prescrittore, rispondente a standard riconosciuti e condivisi di appropriatezza clinica, coerente con il quesito clinico sottinteso alla richiesta di prestazione.

A tal fine il GL ha prodotto un elenco di patogeni e sindromi, affidando ad esperti la stesura di un testo che contenga tutte e solo le informazioni utili per la corretta richiesta, per l'esecuzione analitica e per l'utilizzo dei risultati, avendo come riferimento documenti e materiali fortemente ancorati all'Evidence Based Medicine. I testi vengono discussi in apposite riunioni di consensus, coinvolgendo microbiologi e clinici.

Ad oggi, sono stati prodotti e validati documenti di consensus sulle infezioni da HIV, sulla sifilide e sulle uretriti che saranno illustrati, sottolineando gli aspetti innovativi rispetto alle consuetudini dell'attività diagnostica ed i punti critici. Il numero esiguo dei documenti ed il lungo tempo richiesto per produrli rappre-

sentano il segno dell'impegno richiesto per produrre documenti largamente condivisi. Essi rappresentano però anche un segno di quanto si può fare per qualificare la diagnostica microbiologica, per investire meglio le risorse, per contribuire alla gestione appropriata ed alla cura delle malattie infettive.

relazioni

SESSIONE 8

Infezioni da Biofilm Microbici: antibiotico-resistenza, virulenza, diagnostica e approcci farmacologici

Venerdì 5 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

S8.1

BIOFILM MICROBICI E INFEZIONI UMANE

Donelli G.

*Dipartimento di Tecnologie e Salute,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

I biofilm possono essere definiti come strutture tridimensionali eterogenee costituite da microrganismi a crescita sessile che si moltiplicano immersi in una matrice polimerica esocellulare da essi stessi prodotta. Il carattere non continuo del biofilm è dovuto alla presenza di spazi interstiziali che rendono possibile la diffusione sia dei nutrienti che delle molecole segnale che modulano la densità di popolazione.

La crescita microbica in biofilm si può instaurare nell'uomo sia a livello tissutale che sulle superfici di dispositivi medici. Nel primo caso, gli esempi più noti sono rappresentati dalla placca dentale, dal biofilm microbico multispecie che a livello intestinale funge da efficiente barriera contro i microrganismi patogeni di origine alimentare e dalla flora microbica vaginale a crescita sessile.

È ben noto inoltre come l'impianto temporaneo o permanente nell'organismo di dispositivi medici, quali cateteri vascolari, cateteri urinari, stent biliari, protesi ortopediche, etc., ne espone le superfici alla colonizzazione da parte di specie microbiche diverse, a seconda del distretto corporeo e delle modalità d'inserzione, con successiva formazione di biofilm.

Nonostante sia stato ormai accertato che oltre i due terzi delle infezioni persistenti sono associate alla formazione di un biofilm microbico e i Centers for Disease Control statunitensi abbiano recentemente stimato che il 65% delle infezioni ospedaliere sono associate a microrganismi che crescono in biofilm, esiste ancora una limitata consapevolezza a livello clinico dell'importanza dei biofilm microbici. Vi è in partico-

lare l'esigenza di affrontare in modo adeguato i problemi correlati alla assai più elevata resistenza agli agenti antimicrobici mostrata dai microrganismi a crescita sessile. Il raggiungimento di tale obiettivo è tuttavia subordinato alla messa a punto di metodi appropriati per saggiarne la sensibilità antibiotica.

È inoltre necessario lo sviluppo di strategie alternative o complementari a quelle già in uso per il controllo delle infezioni microbiche, che mirino a prevenire le fasi iniziali e/o siano capaci di intervenire nei processi di maturazione e accrescimento dei biofilm.

S8.2

BIOFILM STAFILOCOCCICI, VIRULENZA E ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Stefani S.

*Dipartimento di Scienze Microbiologiche,
Università degli Studi di Catania (I)*

Staphylococcus aureus è uno dei patogeni più importanti nell'ambito delle infezioni acquisite in nosocomio ed in comunità, responsabile di un molteplice numero di infezioni, dalle più banali a quelle ad elevata severità. La sua patogenicità è in relazione alla espressione di un complesso insieme di fattori di virulenza che possono essere localizzati sulla superficie cellulare o secreti nell'ambiente circostante. Questi diversi fattori sono espressi in modo coordinato durante i diversi stadi dello sviluppo cellulare grazie all'attività concertata di diversi sistemi di regolazione tra cui svolgono un ruolo principale l'*accessory gene regulator (agr)* e il regolatore stafilococcico accessorio *sarA*. È stato messo in evidenza, infatti, che le proteine extracellulari possono essere suddivise in due gruppi basandosi esclusivamente sul momento della loro espressione: proteine che sono espresse solamente ad una densi-

tà cellulare bassa e proteine che, al contrario, sono espresse ad alte concentrazioni cellulari. Ci sono evidenze che il sistema *agr* abbia un ruolo di regolatore positivo di proteine (proteasi, emolisine e lipasi) espresse ad alta densità cellulare (*quorum sensing*), mentre diventa un regolatore negativo di proteine che vengono espresse durante la fase esponenziale di crescita. Da quanto detto risulta evidente che la regolazione specie-specifica di molti determinanti di virulenza, sotto il controllo di numerosi stimoli esterni, possa notevolmente influenzare i fattori di virulenza che ogni volta vengono espressi, con un conseguente impatto sulle diverse potenzialità di causare malattia che ogni ceppo esprime.

Recentemente e da più parti, emergono evidenze che la complessa regolazione *agr*-mediata, possa correlare con altre funzioni del microrganismo, tra le quali ricordiamo appunto la resistenza agli antibiotici (soprattutto nei ceppi VISA) e la produzione di biofilm. Il locus *agr* è influenza, almeno in parte, la formazione di questa complessa matrice-biofilm, coinvolta nella patogenesi degli stafilococchi in infezioni catetere-correlate e/o altre infezioni croniche, e recenti risultati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca, confermano questo ruolo, almeno in *S.aureus*.

Virulenza, capacità di produrre biofilm e il complesso profilo di antibiotico-resistenza, sono fattori che moltiplicano notevolmente la capacità degli stafilococchi e di *S.aureus*, di esplicare la sua azione patogena.

S8.3

RUOLO ED IMPORTANZA DI MOLECOLE SEGNALE NELLA FORMAZIONE DI BIOFILM BATTERICI, E LORO EFFETTO SU MECCANISMI DI PATOGENESI E DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

Landini P.

I microrganismi possono organizzarsi in comunità adese ad una superficie solida dette biofilm, e caratterizzate dalla produzione di fattori di adesione, polisaccaridi capsulari, e fattori di virulenza. La produzione di fattori di adesione e di formazione del biofilm è un determinante di virulenza in molti batteri patogeni. Nei biofilm, i batteri crescono inglobati in una matrice extracellulare costituita sia da fibre di natura proteica, come i pili, che da diversi tipi di polisaccaridi, che insieme compongono la cosiddetta sostanza esopolimerica (EPS). Oltre all'adesione alle superfici solide, la presenza dell'EPS conferisce protezione da stress ambientali, quali lo stress ossidativo, l'attacco da parte dei macrofagi, e ha un ruolo anche nella resistenza agli antibiotici. Inoltre, i biofilm possono presentare anche

una ridotta sensibilità agli antibiotici, rappresentando così un problema nelle infezioni batteriche. La transizione da cellula singola a biofilm e la crescita e mantenimento del biofilm stesso sono regolati in maniera co-ordinata da diverse molecole segnale. Verranno presentati esempi di produzione di fattori di adesione cellulare e di virulenza in relazione alla produzione di molecole segnale in *Pseudomonas aeruginosa* (segnali di quorum sensing) e in enterobatteri (effetto di GMP-diciclico sulla produzione di polisaccaridi capsulari). La detezione (diretta o indiretta) di molecole segnale legate al biofilm potrebbe consentire una valutazione del potenziale di virulenza e di sensibilità agli antibiotici di ceppi batterici isolati clinicamente.

S8.4

METODICHE DI VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA NEI CONFRONTI DI BIOFILM BATTERICI

Zampaloni C.

La ridotta suscettibilità, fino a 10-1000 volte inferiore, agli agenti antimicrobici osservata nei biofilm, ha reso questa comune forma di sviluppo batterico motivo di allarme soprattutto in ambito clinico, dove più del 60% delle infezioni batteriche sono date da biofilm.

La determinazione dell'attività antimicrobica di potenziali prodotti anti-biofilm è la base per il trattamento di queste infezioni. Tuttavia i metodi di indagine normalmente impiegati per le cellule in fase planctonica risultano inadeguati rendendo necessario lo sviluppo di nuove metodiche che tengano conto delle spiccate differenze tra planctonico e sessile.

Inoltre la lotta contro il biofilm non è finalizzata soltanto all'uccisione delle cellule batteriche; i prodotti anti-biofilm potrebbero essere designati per la rimozione dello "slime" del biofilm, per prevenire una possibile ricrescita batterica una volta eliminato il biofilm e ancor prima per impedire l'adesione cellulare al supporto.

I metodi sviluppati negli ultimi anni per la valutazione dell'attività di agenti antimicrobici nei confronti di biofilm batterici hanno cercato di dare risposta a tutti questi obiettivi. Sono metodi semplici o sofisticati, per test di routine o analisi più fini, che utilizzano sistemi stazionari di sviluppo del biofilm (microtiter plates: TSP, MBEC) o a flusso continuo (Rotating disk reactor, flow chamber system), semplici coloranti (alamar blue, cristal violet) o sonde fluorescenti (live/dead kit) per la rilevazione ed anche il supporto della microscopia.

In particolare, due sistemi per la valutazione dell'attività di agenti antimicrobici nei confronti di biofilm batterici, quali il saggio in microtiter plate con succes-

siva conta delle cellule vitali e il flow-chamber system con l'ausilio di marcature fluorescenti e la microscopia confocale laser a scansione verranno descritti, prendendo come esempio uno studio condotto su biofilm a differente organizzazione strutturale di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* trattati con gli antibiotici colistina e ciprofloxacina.

I risultati del presente studio confermano che la formazione del biofilm può conferire incrementata tolleranza antibiotica delle cellule nel biofilm, mostrano anche che tale tolleranza dipende dall'organizzazione strutturale del biofilm, dall'induzione di specifici meccanismi di tolleranza e dall'antibiotico usato.

Il successivo passo nella valutazione dell'attività antimicrobica nei confronti di biofilm batterici dovrebbe essere quello di standardizzare il più possibile i test finora sviluppati così da arrivare rapidamente a definire delle linee guida per il microbiologo impegnato nello studio del biofilm e per il medico che dovrà scegliere la terapia da utilizzare.

relazioni

SESSIONE 9

Aggiornamento in tema di diagnosi e gestione delle sepsi

Venerdì 5 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, SALA BIANCA

S9.1

SEPSI: DEFINIZIONI ED EPIDEMIOLOGIA

Viale P.

*Clinica di Malattie Infettive, Università degli Studi di Udine
- Azienda Ospedaliero - Universitaria di Udine*

La sepsi rappresenta una problematica clinica di assoluta rilevanza proponendosi tra le più comuni cause di morte intra-ospedale, specie nelle Unità di terapia intensiva.

Definita nel 1992 dalla presenza di infezione documentata clinicamente e/o microbiologicamente associata a Sindrome della Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS), ha rappresentato il primo importante tentativo metodologico per la valutazione standardizzata e riproducibile del livello di gravità correlato all'evento infezione. Essa si fonda sul concetto che la concomitanza di infezione e Sindrome della Risposta Infiammatoria Sistemica, definita dalla presenza di almeno due segni e sintomi tra tachicardia ($FC > 90/\text{minuto}$), tachipnea ($FR > 20 \text{ atti/minuto}$), febbre o ipotermia ($TC > 38^\circ\text{C}$ o $< 36^\circ\text{C}$), leucocitosi o leucopenia (leucociti $> 12.000/\text{mmc}$ o $< 4000/\text{mmc}$) definisca una condizione di malattia potenzialmente grave, e secondariamente che sia possibile stabilire un grading di crescente gravità, attraverso la condizione di sepsi grave (sepsi più l'evidenza di un fallimento d'organo) e shock settico (sepsi grave più ipotensione refrattaria al riempimento volemico).

Nonostante la definizione di sepsi faccia riferimento alla presenza di infezione indipendentemente dal sito primario, spesso il termine viene associato a quello di setticemia, ovvero di infezione associata alla presenza di microrganismi in attiva replicazione nel sangue, quindi ad emocolture positive. Questo equivoco sull'interpretazione del termine sepsi è ancora presente in parte della letteratura internazionale e nella terminolo-

gia medica corrente italiana, rendendo difficile un confronto tra dati se non viene chiarito con precisione a quale condizione patologica si riferiscono.

In ogni caso, al di là della variabilità correlata alla definizione, più studi epidemiologici dimostrano come la sepsi rappresenti un evento di significativa rilevanza in termini di sanità pubblica.

Uno degli studi di maggiore valenza numerica, condotto dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) attraverso l'analisi dei codici di dimissione di un vasto campione di ospedali per acuti statunitensi, ha dimostrato un notevole incremento d'incidenza della sepsi nel tempo, da 82.7 casi per 100,000 residenti/anno nel 1979 a 240.4 per 100,000 residenti/anno nel 2000. Di contro la mortalità intra-ospedaliera risultava ridotta, da 27.8% nel periodo 1979-84 a 17.9% in quello 1985-2000. La proporzione di pazienti con almeno un fallimento d'organo, quindi con sepsi grave si incrementava dal 19.1% nel 1979 fino ad oltre il 30% negli ultimi anni di osservazione; la sepsi grave aveva un chiaro effetto sulla mortalità che, inferiore a 15% nei soggetti con sola sepsi, saliva proporzionalmente passando alla sepsi severa ed allo shock settico, dove raggiungeva valori superiori a 70%.

Degna di menzione è l'evidenza che intorno alla fine degli anni '80 i microrganismi gram positivi superavano per frequenza i gram negativi, mentre la frequenza di setticemie ad eziologia fungina aumentava nella misura del 207%. Tale andamento è certamente in rapporto all'ascesa epidemiologica di *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp* e *Candida spp* in ambito nosocomiale.

In tempi recenti uno studio epidemiologico europeo prospettico, condotto in Spagna, su un denominatore di oltre 18.500 ricoveri, evidenziava 702 diagnosi di sepsi che definivano incidenze cumulative pari a 357 casi per 100.000 residenti nell'area di riferimento degli ospedali coinvolti. Undici casi risultavano acquisiti terapia intensiva, 106 in altri reparti ospedalieri, 585 in comunità. Tra questi ultimi, i siti d'infezione primaria prevalenti erano l'apparato respiratorio (56%), quello urinario (20%), il distretto addominale (13.5%) e l'ap-

parato cutaneo (5%). I casi nosocomiali riconoscevano gli stessi siti primari ma in proporzioni differenti: distretto addominale 27%, polmone 26%, vie urinarie ed apparato ginecologico 24%, cute e tessuti molli 16%. In terapia intensiva prevalevano le infezioni a livello polmonare (55%), le infezioni correlate a cate-tere vascolare centrale (18%) e le infezioni di vie urinarie (18%).

La mortalità intra-ospedaliera di tutti i pazienti settici era pari a 12,8%; essa però scendeva a 6,7% per i casi di sepsi per risalire a 20,7% nei casi di sepsi severa e giungere a 45,7% per lo shock settico. Nei pazienti con sepsi grave, la mortalità era fortemente dipendente dalla sede di ricovero: i pazienti ricoverati in terapia intensiva avevano una mortalità pari a 11% mentre quelli trattati fuori dalla terapia intensiva una mortalità del 26%. ($p < .001$).

Se dunque la diagnosi di sepsi e di sepsi severa è così importante è necessario disporre di una definizione più affidabile in termini di specificità, comprendente più parametri precocemente esaustivi sia della risposta infiammatoria sia del fallimento di uno o più organi. A tal proposito nell'anno 2001 la definizione originale è stata aggiornata aggiungendo ai parametri originari altri segni, sintomi ed esami biochimici idonei a definire lo stato infiammatorio, l'entità della perfusione tissutale, i segni precoci di disfunzione d'organo, condizioni che mediano la gravità del quadro clinico ed il rischio di outcome sfavorevole. I dati aggiuntivi fanno riferimento ai valori di glicemia, di lattacidemia, alla pressione arteriosa sistolica, al refilling, al mental status ed a Procalcitonina e Proteina C Reattiva.

Tale definizione appare maggiormente in grado di identificare le condizioni di infezione a massimo rischio di mortalità con un approccio di grande semplicità diagnostica e di minimo costo.

S9.3

SEPSI: LA GESTIONE DELLA CRITICITÀ CLINICA.

Tavio M.¹, Moscariello F.²

¹Clinica di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine, via Colugna 50, 33100 Udine.

²Pronto Soccorso e medicina d'Urgenza, Dipartimento di Emergenza dell'Ospedale Santa Maria degli Angeli, via Montereale 24, 33080 Pordenone.

La necessità di far corrispondere al problema della sepsi uno sforzo veramente globale, in termini sia di collaborazione scientifica fra i diversi Paesi che di coordinamento di competenze disciplinari complementari, è in atto dal 1991, allorché vennero fornite ai clinici e ricercatori le prime importanti definizioni dei vari gradi della sepsi e della risposta infiammatoria ad

essa associata (SIRS). In anni più recenti l'apparato concettuale alla base di tali definizioni è stato opportunamente rivisitato, senza conseguire tuttavia sostanziali modifiche sul piano pratico; infatti, l'aggiornamento occorso nel 2001 si è concentrato sull'espansione dei segni e sintomi di sepsi piuttosto che sul cambio delle relative definizioni, rimaste immutate; dal 2002 inoltre, è in atto una importante campagna di sensibilizzazione sul tema, la cosiddetta "Survival Sepsis Campaign (SSC)", le cui linee guida suddividono opportunamente le competenze fra medici di Pronto Soccorso, Intensivisti, Infettivologi, Microbiologi, Pediatri. Siccome il prossimo auspicabile passo sullo scacchiere della SSC è costituito dalla diffusione e dalla implementazione degli interventi diagnostici e terapeutici insieme alla misurazione obiettiva della loro ricaduta clinica, in questa presentazione vengono affrontati e commentati sia i punti cardinali in cui si articola il trattamento del "paziente settico" (terapia infusoria, terapia antibiotica, vasopressori, inotropi, steroidi, proteina C attivata, controllo glicemia...), che il sistema di allerta e di intervento vigente presso l'Ospedale di Pordenone. Conseguentemente,

- 1) verrà delineato il contenuto del pacchetto delle misure terapeutiche urgenti che devono essere attivate secondo i criteri della cosiddetta "early goal directed therapy (EGDT)" per riuscire ad intervenire efficacemente sui fenomeni a cascata che stanno presumibilmente all'origine del processo di attivazione dello shock settico, via finale comune a prognosi frequentemente infausta;
- 2) verrà illustrato un sistema di sorveglianza in grado di attivare nel più breve tempo possibile figure professionali diverse e complementari, in uno sforzo di coordinamento unitario.

S9.4a

LA DIAGNOSI DI LABORATORIO: NUOVE PROSPETTIVE PER LA RISPOSTA ALLA CRITICITÀ - 1) METODI BIOMELECOLARI

Raglio A.¹, Pecile P.²

¹Microbiologia e Virologia, AO Ospedali Riuniti, Bergamo

²Microbiologia e Virologia, Ospedale Careggi, Firenze

Introduzione. L'emocoltura tradizionale (BC) presenta limiti ormai ben conosciuti: la tempestività (48 ore per un primo risultato) e la sensibilità (15-25%). Sono necessari nuovi approcci diagnostici e le tecniche di biologia molecolare sembrano offrire interessanti applicazioni.

Obiettivi. Lo scopo di questa relazione è di presentare i dati riguardanti l'utilizzo del nuovo sistema in Real-Time PCR (SeptiFast, Roche Diagnostics) e il suo

impatto clinico in confronto con i risultati delle BC.

Metodi. BC è stata eseguita con BactAlert System (BioMerieux) con incubazione di 7 giorni. SeptiFast è stato eseguito con LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics). Lo studio è stato effettuato in 3 fasi successive su campioni raccolti contemporaneamente per PCR e BC da malati con SIRS.

Per ogni malato sono stati raccolti dati clinici e di laboratorio e i risultati di esami microbiologici eseguiti su altri campioni. Tutti i dati sono stati poi valutati con i clinici dei vari reparti e con i microbiologi e i clinici referenti dei vari centri.

Resultati. Il primo studio, Alpha2 del 2004 con 355 malati arruolati ha dimostrato un tasso di positività del 18.2% per BC e del 29.5% per PCR. Fra i 174 campioni positivi per PCR, 124 (72%) isolati non sono stati identificati da BC. Oltre la metà degli isolati con PCR non rilevati da BC sono stati confermati da altre indagini microbiologiche.

Lo Studio Beta del 2005 arruolava 381 malati e dimostrava un tasso di positività del 9.4% per BC e del 27% per PCR. Anche in questo studio si raggiungeva un concordanza del 90% se si valutavano sia i risultati di Bc che quelli di altre indagini microbiologiche.

Lo studio di Clinical utility, tuttora in fase di valutazione finale, arruolava 467 malati. Fra i 126 (27%) malati positivi in PCR, 57 (45.2%) erano già coperti da corretto trattamento empirico. Fra i 69 non trattati: 8 (6,3%) isolati sono stati classificati come contaminanti, 11 (8,7%) avrebbero indotto un trattamento inutile, 10 (7.9%) sono stati già corretti dai clinici prima del risultato della PCR, 40 (31.7 % fre tutte le PCR positive; o 8.6% fra tutti i test eseguiti) hanno dimostrato la possibilità di un trattamento antibiotico più tempestivo (media 2.5 giorni prima, mediana 2.1).

Conclusioni. L'analisi dei dati è complicata dalla mancanza di un gold standard, avendo le BC una bassa sensibilità. La PCR ha dimostrato una maggiore sensibilità e tempestività rispetto a BC. I costi del prodotto e il tempo tecnico necessario ne suggeriscono un uso mirato. Probabilmente la valutazione finale dello studio di Clinical utility potrà individuare i reparti ed i malati per i quali potrebbe essere più utile l'uso della PCR.

S9.4b

LA DIAGNOSI DI LABORATORIO: NUOVE PROSPETTIVE PER LA RISPOSTA ALLA CRITICITÀ - 2) RICERCA ENDOTOSSINE

Pecile P.², Raglio A.¹

¹ Microbiologia e Virologia, AO Ospedali Riuniti, Bergamo

² Microbiologia e Virologia, Ospedale Careggi, Firenze

Introduzione. Lo shock è un grave stato patologico,

caratterizzato da un'ipoperfusione tissutale sistemica che non risponde alla reidratazione, con associazione di sintomi di insufficienza d'organo, necessità di inotropi e vasopressori (definizione dalla Consensus Conference ACCP/SCC). La mortalità generale per i pazienti con tale patologia oscilla tra il 25 e il 50%. Spesso i risultati peggiori si verificano quando la terapia non sia stata avviata abbastanza presto, e tuttavia, una volta stabilitasi l'acidosi metabolica scompensata grave, specialmente in associazione a insufficienza multiorgano, è verosimile che lo shock settico abbia carattere di irreversibilità nonostante la terapia di supporto. Lo shock settico è comune soprattutto con infezioni sostenute da organismi gram -, ma anche da cocci gram positivi. Nella sepsi da gram- la maggior responsabile dell'instaurarsi dello shock settico è l'endotossina (LPS).

Obiettivi. L'obiettivo di questa relazione è di presentare i dati ottenuti con la nuova tecnica EEA ENDO-TOXIN ACTIVITY ASSAY (Estor) in pazienti con sospetto shock settico e l'impatto clinico legato all'informazione della presenza o meno di endotossine nel sangue. Tale metodica si basa sulla reazione LPS / anticorpo che produce una reazione ossidativa, in presenza di Zymosan, sensibile alla chemiluminescenza che risulterà proporzionale alla concentrazione del complesso antigene- anticorpo presente nel sangue.

Metodi. Per ogni malato con sospetto di shock settico sono stati raccolti i normali 3 set di emocolture (sistema Bactec, B.D.), incubati per 5 giorni secondo il nostro protocollo, e un campione di sangue in provette con EDTA da almeno 2 ml per la tecnica EEA.

L'indagine per la ricerca della endotossina è sempre stata effettuata entro le 3 ore dal prelievo.

Risultati. Ad oggi lo studio ha arruolato 11 pazienti per un totale di 18 campioni. Per tutti i pazienti l'emocoltura è risultata negativa, mentre, per la ricerca delle endotossine, 3 pazienti sono risultati positivi con valori superiori a 0.60 EAA unità (cut off che indica un elevato rischio di shock settico). Dei tre pazienti uno è deceduto, 2 sono stati sottoposti a processo di ultrafiltrazione che ha portato alla loro stabilizzazione.

Conclusioni: il test, da eseguire su sangue intero, è di semplice e rapida (circa 30 minuti) esecuzione. Nonostante una specificità del 44% (la reazione può essere positiva anche in presenza di tossine di gram +) presenta un'alto valore predittivo di negatività in caso di assenza di un coinvolgimento da gram - e sembra ben correlare con la gravità della malattia. E' comunque auspicabile che, per un suo uso appropriato, vengano concordati protocolli condivisi sia dal microbiologo che dal clinico.

relazioni

SESSIONE 10

Aspetti diagnostici, epidemiologici e di sorveglianza di infezioni batteriche di origine ambientale

Venerdì 5 ottobre 2007, ore 08.30 - 10.15, SALA BLU

S10.1

IL GENERE CLOSTRIDIUM CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALLA SPECIE DIFFICILE TOSSINOGENICO: PROBLEMATICA NOSOCOMIALE

Dei R., Nicoletti* P.

Dipartimento Sanità Pubblica, Università di Firenze,
*Laboratorio Batteriologia e Virologia, AOUC, Firenze

Clostridium difficile è responsabile di infezioni intestinali tipicamente associate a trattamento antibiotico che vanno dalla frequente e non grave diarrea alla rara ma grave colite pseudomembranosa.

Il microrganismo si replica nell'intestino dell'uomo e degli animali, dove è ritenuto un colonizzatore transiente. I soggetti colonizzati libereranno nell'ambiente un numero più o meno abbondante di spore e conseguente persistenza prolungata negli ambienti contaminati. La presenza di *C. difficile* in natura è quindi piuttosto estesa; è comune, di conseguenza, che l'uomo possa incontrarlo e, probabilmente, il più delle volte in maniera inosservata. La virulenza e la patogenicità di *C. difficile* dipendono dalle caratteristiche di tossinogenicità del ceppo, variabili all'interno della specie, ma anche dall'equilibrio del nostro microbiota intestinale; non a caso l'introduzione e ampio uso degli antibiotici sono stati gli elementi scatenanti che hanno portato alla "riscoperta" del germe. Ne deriva che una più ampia contaminazione ambientale si realizzerà dove più concentrati saranno i colonizzati ed ancora di più i malati, come tipicamente sono gli ospedali o le strutture di ricovero in genere dove si aggiunge il probabile impiego di antibiotici per la patologia di base dei pazienti; *C. difficile* è ormai annoverato tra i patogeni nosomiali.

L'interesse per questo microrganismo è andato crescendo negli ultimi anni per l'emergenza di ceppi, quali il ribotipo O27, particolarmente virulenti associati ad un

andamento più grave, anche mortale, dell'infezione ed ad una non buona risposta al trattamento standard. Inoltre una maggiore attenzione si sta prestando alle infezioni da *C. difficile* community-acquired.

S10.2

IL GENERE BURKHOLDERIA CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALLA SPECIE CEPACIA: CONSIDERAZIONI IN MARGINE AD UN FOCOLAIO OSPEDALIERO

Casolari C., Pecorari M.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Integrata Ospedaliero-Universitaria di Modena

Il genere *Burkholderia* presenta una complessa tassonomia che ha subito nel corso degli anni numerose revisioni. Contiene attualmente 34 specie, 9 delle quali rappresentano un gruppo strettamente correlato, indicato come *Burkholderia cepacia* complex. Per la similarità fenotipica di numerose specie e le costanti modificazioni tassonomiche, la corretta identificazione di *Burkholderia* risulta difficile. Le specie di questo genere, ampiamente diffuse in natura e capaci di sopravvivere in condizioni minimali di nutrimento, sono di notevole interesse ecologico e biotecnologico; in alcuni casi causano malattie nelle piante, negli animali e nell'uomo e sono state recentemente considerate come potenziali agenti di bioterrorismo. Oltre a *Burkholderia pseudomallei* agente di melioidosi, molte altre specie possono causare infezioni opportunistiche. In particolare i microorganismi inclusi in *B. cepacia* complex, noti da tempo come causa di polmonite in soggetti con fibrosi cistica, sono oggi considerati patogeni emergenti, responsabili di infezioni in pazienti ospedalizzati e segnalati all'origine di epidemie nosocomiali da fonte comune, identificata per lo più in soluzioni disinfettanti contaminate.

Una nota editoriale dei CDC del 1998 sottolinea per la prima volta la possibilità di infezioni respiratorie da *B.*

cepacia in reparti di Rianimazione associate a colluttori non alcolici, riportando due eventi epidemici occorsi in ospedali americani. I pazienti sottoposti a ventilazione meccanica sono infatti particolarmente esposti all'azione dei patogeni presenti nel cavo orale o nelle prime vie aeree, e presentano un alto rischio di colonizzazioni e di infezioni respiratorie in rapporto alla carenza delle normali funzioni protettive legate ai meccanismi mucociliari e al riflesso della tosse. La nostra segnalazione di una epidemia da *B. cepacia* associata all'uso di un collutorio contaminato in due reparti di Terapia Intensiva apporta un ulteriore contributo all'argomento. Nel nostro caso l'origine dell'evento è stato identificato nella contaminazione dell'acqua deionizzata utilizzata per la diluizione al 4% della clorexidina nella preparazione del collutorio. L'epidemia ha avuto la durata di 14 mesi e ha coinvolto 43 pazienti con 10 casi di infezioni respiratorie, prima che si identificasse la fonte e si sospendesse l'uso della soluzione. La tipizzazione molecolare con RAPD-PCR di 58 ceppi derivati dai pazienti, dal collutorio e dall'acqua deionizzata, ha evidenziato lo stesso genotipo nei campioni clinici e nella soluzione di clorexidina. Il reperto di genotipi differenti negli isolati provenienti dall'acqua indica la probabile selezione da parte del disinfettante di un clone resistente a partire dalla popolazione microbica policlonale presente, responsabile dei casi di infezione e di colonizzazione. La cessazione degli isolamenti contestuale alla sospensione dell'uso del collutorio ha confermato il rapporto tra il disinfettante e l'origine dei casi. Si sottolinea pertanto il ruolo emergente di microrganismi ambientali come *B. cepacia* nel determinare patologie opportunistiche ed eventi epidemici nosocomiali.

S10.3

PATOGENI ENTERICI: RETI DI SORVEGLIANZA NAZIONALI ED INTERNAZIONALI. IL CENTRO DI RIFERIMENTO REGIONALE DELL'EMILIA-ROMAGNA

Cirillo G., Bacchi M., Ortali F.

ARPA Emilia - Romagna

L'esigenza di costituire Centri di Riferimento nell'ambito di un sistema nodale, sorge da motivi scientifico-culturali ed economici. La conoscenza microbiologica ha seguito lo sviluppo avutosi nelle altre discipline, raggiungendo oggi i suoi massimi livelli. Questo comporta un maggior onere, non sempre sostenibile, da parte di ogni singolo Laboratorio per essere in condizioni di rispondere alle richieste di prestazioni. Lo sviluppo dei CdR risponde pertanto a perseguire livelli di miglioramento qualitativi e di produttività nell'attività

svolta e ad evitare la dispersione dei dati che in Epidemiologia costituiscono un fattore molto importante. Il CdR di Forlì opera da circa 10 anni e ha ampliato costantemente i clienti fino a raccogliere la quasi totalità dei Laboratori di Microbiologia. I centri periferici, afferenti al CdR, sono costituiti dai Laboratori di Microbiologia delle sezioni ARPA delle 9 Province Emiliano-romagnole che effettuano ricerche su matrici ambientali come acque superficiali, potabilità, balneazione, terme, etc. Vi sono poi i Laboratori di Microbiologia clinica Ospedalieri e Dipartimenti di Sanità Pubblica che inviano ceppi e/o schede per la sierotipizzazione completa di *Salmonella* sp. Dobbiamo ammettere che i dati umani sono tuttora sottostimati in quanto mancano quelli relativi ai tre grandi Policlinici regionali (Bologna, Modena e Parma). Laboratori privati e aziendali del settore agro-alimentare alquanto sviluppato nella nostra Regione. Nelle nostre casistiche non figurano i dati relativi agli isolamenti negli animali che sono di pertinenza della rete Entervet che raccoglie gli Istituti di Zooprofilassi in una rete nazionale parallela che afferisce anch'essa nel sistema Enternet. Il nostro laboratorio attua procedure analitiche dedicate e accreditate Sinal N° 0249. Esegue un invio mensile dei dati alla sede centrale italiana del progetto Enternet (ISS Roma), pubblica un Rapporto Annuale con invio cartaceo e telematico agli addetti ai lavori. E' inoltre inserito in alcuni circuiti di proficiency test nazionali ed internazionali. Ci sono quindi tutte le premesse che i dati prodotti siano attendibili. Presentiamo i dati relativi all'ultimo biennio 2005/2006 sugli isolamenti di *Salmonella* sp effettuati in Emilia-Romagna evidenziando le differenze qualitative e quantitative che si verificano fra i sierotipi di origine ambientale e umana. I sierotipi di maggior isolamento e l'attività antimicrobica dei ceppi di origine ambientale rispetto a quelli clinici. Una osservazione speciale a *S. Veneziana*, presente costantemente da circa 10 anni nelle matrici ambientali fino a diventare il secondo sierotipo isolato, ma senza notevoli riscontri clinici.

S10.4

PATOGENI ENTERICI: RETI DI SORVEGLIANZA NAZIONALI E INTERNAZIONALI

Luzzi I.

Istituto Superiore di Sanità, Roma

La prevenzione e il controllo delle infezioni da patogeni enterici trasmessi da alimenti dipende in larga misura dal riconoscimento degli episodi epidemici attraverso un idoneo sistema di sorveglianza.

L'incidenza delle infezioni trasmesse da alimenti è in costante aumento, le caratteristiche relative alle

modalità di trasmissione sono cambiate, tra gli agenti eziologici emergono sempre più frequentemente agenti zoonotici che riconoscono diversi serbatoi animali e possono essere trasmessi all'uomo da un'infinità varietà di alimenti di origine animale.

Di fronte a questo mutato scenario anche la sorveglianza dei patogeni enterici deve assumere caratteristiche diverse. I sistemi di sorveglianza basati sui laboratori rispecchiano l'evoluzione in materia di prevenzione e controllo.

L'integrazione tra i vari settori della microbiologia, clinica, veterinaria, alimentare e ambientale, l'utilizzo di tecniche di laboratorio innovative, l'uso dei metodi molecolari di tipizzazione consentono oggi di identificare episodi epidemici diffusi in aree geografiche estese, di stabilire relazioni tra casi di malattia apparentemente sporadici, di riconoscere il veicolo di infezione e risalire ai serbatoi dei diversi agenti eziologici.

Il sistema di sorveglianza dei patogeni enterici trasmessi da alimenti ENTER-NET rappresenta il prototipo della sorveglianza basata sui laboratori. Il sistema attivo in Europa da anni si prefigge di studiare la circolazione dei diversi sierotipi di *Salmonella* e di *E. coli* produttori di verotossina, di seguire la diffusione di altri patogeni enterici come il *Campylobacter*, di mantenere attivo un sistema di allerta internazionale al fine di identificare episodi epidemici anche a carattere transnazionale.

In Italia il sistema è coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità e si avvale della partecipazione dei laboratori del Servizio Sanitario Nazionale e di una rete di laboratori regionali di riferimento. Il sistema di sorveglianza italiano ha inoltre la caratteristica di raccogliere dati sugli isolamenti di *Salmonella* da campioni origine ambientale e di origine animale attraverso una rete parallela, Enter-vet, coordinata dal centro nazionale di riferimento per le *Salmonelle* dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

La struttura e le caratteristiche dei sistemi di sorveglianza Enter-net e Enter-vet Italia consentono quindi di valutare il valore aggiunto alla sorveglianza delle infezioni zoonotiche a trasmissione alimentare dell'uso routinario dei metodi di tipizzazione molecolare per i principali agenti zoonotici quali *Salmonella*, *Campylobacter* ed *E. coli* 0157 e altri patogeni trasmessi da alimenti isolati da fonte umana e non umana.

S10.5

IL GENERE SALMONELLA: EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE

Nastasi A.

L'epidemiologia delle salmonelle in Italia si identifica ormai con i sierotipi di primaria origine animale, infatti nello scenario nazionale le febbri tifoidee rappresentano ormai reperti sporadici legati a casi d'importazione.

La ricostruzione delle catene di contagio nelle infezioni da agenti responsabili di zoonosi, come le salmonellosi, oltre duemila sierotipi anche se soltanto un centinaio si sono adattate all'uomo, sono problematiche anche per la bassa sensibilità delle metodiche di tipizzazione fenotipiche.

L'utilizzo di metodiche di biologia molecolare, come la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e la Single Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism (SE-AFLP) ha permesso di superare, ad esempio, la sierotipo specificità della tipizzazione fagica.

Salmonella enterica sierotipo Enteritidis rappresenta in Italia il secondo sierotipo più frequente dopo *S. Typhimurium*. La grande diffusione di *S. Enteritidis* su scala mondiale, legata alla capacità di colonizzare l'ovidotto delle galline, ha portato questo sierotipo ad essere per molti anni prevalente ed oggi, in ogni caso, un reperto costante nelle infezioni umane. La tipizzazione fagica, che ha permesso di studiare l'evolversi della diffusione pandemica nelle singole Regioni, è purtroppo un patrimonio di pochi laboratori, di solito su scala nazionale, per problemi legati alla disponibilità dei fagi e alla standardizzazione fra laboratori.

L'introduzione di metodiche di tipizzazione molecolare come la PFGE, adottata in campo internazionale dai laboratori di riferimento più accreditati, ha permesso di sviluppare una valida alternativa in grado di ben discriminare i cloni circolanti. La PFGE, se ha risolto i problemi legati alla tipizzazione fagica, presenta costi d'acquisto e gestione delle apparecchiature non alla portata dei laboratori di primo e secondo livello.

In questi laboratori, di supporto all'inchiesta di primo intervento, è necessario poter disporre di metodiche che siano in grado di garantire una ricostruzione epidemiologica dell'intervento a basso costo. Abbiamo, a Firenze di recente, messo a punto e validato una SE-AFLP modificata raggiungendo lo scopo di ottenere una metodologia poco costosa con risultati non dissimili in termini di sensibilità della PFGE. A tale scopo si è applicata la SE-AFLP modificata nella lettura ed interpretazione della storia naturale di *Salmonella Enteritidis* negli ultimi tre anni nel territorio fiorentino.