associazione microbiologi clinici italiani

Ente del Terzo Settore

Rif.2023-07

**PERCORSO DIAGNOSTICO**

# ENTERITI DI ORIGINE INFETTIVA

Gruppo di Lavoro Organizzativo dei Percorsi Diagnostici (GLOPD)

Coordinatore: Cristina Giraldi
c.giraldi54@gmail.com
Proprietà intellettuale di AMCLI ETS.

Nel caso i contenuti siano utilizzati è necessario citare il Percorso Diagnostico nel seguente modo: AMCLI ETS. Percorso Diagnostico - Enteriti di origine infettiva Rif. 2023-07.

Associazione Microbiologi Clinici Italiani ETS (AMCLI ETS)
Via C. Farini 81 - 20159 Milano - T. 02 66801190 - segreteriaamcli@amcli.it N. 26168 iscrizione RUNTS - sez. "G - altri enti del Terzo Settore" - Iscrizione REA MI - 1969948 C.F. 06653690153 - P.I. 12404560158

## REFERENTE

*Andreoni Stefano,* SCDO Microbiologia e Virologia- Azienda Ospedaliero/Universitaria Maggiore della Carità – Novara

## ESTENSORI DEL DOCUMENTO:

*Ambretti Simone,* Unità Operativa di Microbiologia - Azienda Ospedaliero Universitaria di Bologna IRCCS Policlinico di S.Orsola – Bologna

*Besutti Valeria,* UOC Microbiologia e Virologia - Azienda Ospedale-Università Padova

*Bracco Silvia,* SC Microbiologia e Virologia - ASST Papa Giovanni XXIII – Bergamo

*Fazii Paolo*, UOC Microbiologia e Virologia_ P.O. Spirito Santo - Pescara

## REVISORI INTERNI

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani

## REVISORI ESTERNI

*Gaia Scavia,* Istituto Superiore di Sanità, Dip. Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, EU Reference Laboratory for E. coli - Roma

## *Sommario*

1. GENERALITÀ ..... 5
2. DEFINIZIONI ..... 6
3. ASPETTI CLINICO-EPIDEMIOLOGICI ..... 7
4. SEGNI – SINTOMI ..... 9
5. EZIOLOGIA ..... 9
6. ASPETTI PATOGENETICI ..... 10
7. APPROCCIO DIAGNOSTICO ..... 11
7.1 Esame microbiologico delle feci ..... 11
7.2 Materiali – Modalità di raccolta e trasporto ..... 12
7.3 Indagini- Esame microscopico/Leucociti fecali ..... 14
7.4 Indagini- Esame colturale ..... 14
7.5 Indagini- Esame colturale ..... 14
7.6 Indagini- Esame colturale ..... 15
7.7 Indagini- Esame colturale. Terreni di coltura nel sospetto di tossinfezione ..... 17
7.8 Indagini- Esame colturale. Terreni di coltura nel sospetto di diarrea da antibiotici ..... 17
7.9 Indagini-Emocoltura-Sierodiagnosi ..... 18
7.10 Indagini- Identificazione ..... 18
7.11 Indagini- Ricerca antigeni/tossine ..... 19
7.12 Indagini- saggio di citotossicità ..... 21
7.13 Indagini- sistemi molecolari ..... 21
7.14 Indagini- biosensori ..... 25
8. ALGORITMI DIAGNOSTICI ..... 25
9. RESISTENZE BATTERICHE ..... 26
EZIOLOGIA – SCHEDE TECNICHE - BATTERI ASSOCIATI AD INFEZIONI INTESTINALI ..... 30
*Escherichia coli* ..... 30
ETEC ..... 30
EPEC ..... 31
EIEC ..... 32
STEC-VTEC-EHEC ..... 33
EAEC – EaggEC ..... 34
DAEC ..... 36

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

AIEC ..... 36
*Salmonella* ..... *37*
*Shigella* ..... *40*
*Campylobacter* ..... *42*
*Yersinia enterocolitica* ..... *43*
*Vibrio* ..... *44*
*Aeromonas* ..... *46*
*Plesiomonas* ..... *47*
*Listeria* ..... *48*
EZIOLOGIA - SCHEDE TECNICHE ..... 49
BATTERI ASSOCIATI A TOSSINFEZIONI ALIMENTARI ..... 49
*Clostridium perfringens* ..... *49*
*Clostridium botulinum* ..... *50*
*Staphylococcus aureus* ..... *50*
*Bacillus cereus* ..... *51*
EZIOLOGIA - SCHEDE TECNICHE ..... 53
BATTERI ASSOCIATI A DIARREE NOSOCOMIALI ..... 53
**Clostridium (Clostridioides) difficile** ..... **53**
PATOGENI EMERGENTI ..... 57
*Arcobacter buzleri* ..... *57*
*Bacteroides fragilis* ..... *57*
*Edwardsiella tarda* ..... *58*
*Escherichia albertii* ..... *58*
*Klebsiella oxytoca* ..... *58*
*Providencia alcalifaciens* ..... *58*
EZIOLOGIA - SCHEDE TECNICHE ..... 59
ENTERITI VIRALI ..... 59
Rotavirus ..... 59
Adenovirus ..... 60
Norovirus (Calicivirus) ..... 61
Sapovirus ..... 62
Astrovirus ..... 62
Coronavirus ..... 62
Enterovirus ..... 62
EZIOLOGIA – ENTERITI PARASSITARIE ..... 63

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

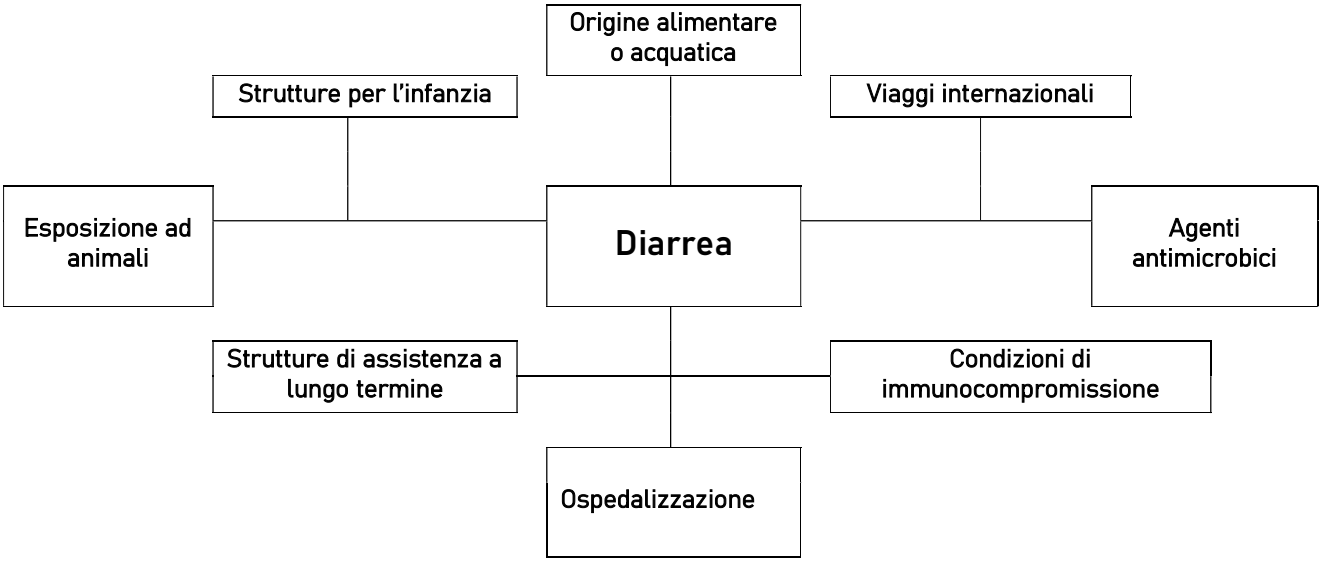
# 1. GENERALITÀ

Le malattie infettive d'origine alimentare rappresentano una delle cause più importanti di morbilità e mortalità nel mondo. La gastroenterite infettiva rappresenta infatti un problema sanitario mondiale con circa 2 miliardi di casi di diarrea che si verificano annualmente, causando oltre 2 milioni di decessi ogni anno. Le malattie diarroiche provocano 1 decesso infantile su 9 in tutto il mondo, rendendo la diarrea la seconda causa di morte tra i bambini di età inferiore ai 5 anni.

Il maggior carico di diarrea infettiva si verifica nei paesi a basso e medio reddito, in relazione all'approvvigionamento di acque non sicure, alle carenze nutrizionali e ai servizi igienico-sanitari inadeguati e scadenti. In questi paesi la diffusione di malattia diarroica nei bambini sotto i 5 anni è enorme, contribuendo alla malnutrizione che a sua volta accresce il rischio di diarrea infettiva, associandosi a ritardi nella crescita e nello sviluppo cognitivo. Nei paesi a basso reddito, i bambini di età inferiore ai tre anni sperimentano in media tre episodi di diarrea ogni anno. Ogni episodio priva il bambino del nutrimento necessario alla crescita. Di conseguenza, la diarrea è una delle principali cause di malnutrizione.

Anche nei Paesi ad alto reddito tuttavia, lo sviluppo economico crea opportunità per l'introduzione e la trasmissione di agenti patogeni enterici, rappresentando un serio problema sanitario.

Le sindromi diarroiche dipendono generalmente dall'ingestione di alimenti o bevande infette ma possono derivare da un contatto con animali o materiali infetti, conseguire ad una trasmissione da persona a persona o sopraggiungere per l'ingestione di *droplets* infetti. I viaggi nel mondo e le connessioni internazionali, le importazioni, la distribuzione di alimenti, così come l'adozione di comportamenti errati di manipolazione, conservazione e preparazione degli alimenti, anche in ambito domestico, possono contribuire ad aumentare il rischio di sindromi diarroiche. Tra i fattori di rischio vanno anche presi in considerazione i sistemi idrici municipali, l'uso diffuso di assistenza all'infanzia, assistenza a lungo termine, il ricovero in ospedale e le strutture acquatiche ricreative (Figura 1).



Gli alimenti, così come l'acqua, possono fungere da semplice veicolo di microrganismi, oppure rappresentare il substrato in cui essi possono moltiplicarsi. I microrganismi coinvolti (batteri, virus, miceti, protozoi) possono esercitare il loro potenziale effetto patogeno esclusivamente a livello dell'apparato digerente o possono causare danno sia localmente, sia in altre sedi corporee, utilizzando l'apparato digerente come punto di partenza.

## 2. DEFINIZIONI

Il termine **enterite** viene utilizzato per indicare uno stato infiammatorio a carico dell'intestino tenue. I termini **colite** ed **enterocolite** indicano un interessamento del colon, mentre quello di **gastroenterite** implica un coinvolgimento, in termini di sintomatologia (nausea, vomito), del primo tratto del tubo digerente. Si definisce **dissenteria** una sindrome caratterizzata da diarrea ricca di muco e frequentemente di sangue.

La **diarrea** può essere definita come disturbo dell'alvo legato ad un'alterazione della funzionalità intestinale: tale disturbo si manifesta con una diminuzione di consistenza delle feci (feci non formate, molli, liquide), legata ad un incremento del volume e del contenuto d'acqua, e/o con un incremento della frequenza di scariche (≥ 3 al giorno).

WHO (*World Health Organization*), IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) e ACG (*American College of Gastroenterology*) definiscono la diarrea come condizione caratterizzata da 3 o più episodi di emissione di feci non composte o liquide al giorno. L'emissione frequente di feci composte non è da considerarsi diarrea.

In relazione alla durata, la diarrea **acuta** è riconducibile ad un episodio con sintomatologia di durata inferiore a 14 giorni (ulteriormente suddivisa in diarrea acquosa acuta e diarrea ematica acuta che durano <7 giorni e diarrea prolungata che dura 7–13 giorni), mentre la diarrea **persistente** è quella di durata superiore a 14 giorni (14-29); per alcuni autori una diarrea superiore a 30 giorni andrebbe definita come **cronica**.

Rispetto al quadro clinico-sintomatologico, la diarrea può essere considerata **lieve**, **moderata** o **severa**, condizione quest'ultima che comporta l'allettamento del paziente.

La **diarrea infettiva** è quella forma di turba dell'alvo legata ad un episodio d'infezione (batteri, virus, parassiti) a carico di intestino tenue e/o colon. Con frequenza in crescita nei Paesi ad alto reddito, la diarrea può anche essere di origine non infettiva: in questi casi può essere determinata da intolleranza ai cibi, da disordini intestinali, quali la sindrome dell'intestino irritabile, o da malattie intestinali, quali colite ulcerosa, morbo di Crohn o morbo celiaco o quale reazione all'impiego di medicinali.

# 3. ASPETTI CLINICO-EPIDEMIOLOGICI

Le malattie diarroiche rappresentano, dopo le malattie respiratorie, la seconda causa di morbilità e mortalità nel mondo, in particolare nei paesi in via di sviluppo. Le condizioni di salute e l'età contribuiscono a condizionare la suscettibilità dei soggetti alle malattie gastroenteriche: sottopopolazioni a maggior rischio d'infezione sono rappresentate da bambini di età inferiore a 5 anni, anziani (età superiore a 60 anni), soggetti portatori di malattie croniche (diabete), malati di AIDS e in generale da tutti i soggetti immunocompromessi. La malattia diarroica è responsabile della morte di oltre 2000 bambini ogni giorno, rappresentando la seconda principale causa di mortalità sotto i cinque anni. Per i bambini con HIV il tasso di mortalità è 11 volte superiore. La diarrea è presente a livello globale in tutte le regioni e popolazioni. Tuttavia, una proporzione iniqua di morbilità e mortalità per diarrea, si verifica nei paesi a basso reddito, che hanno meno risorse e infrastrutture meno solide per gestire il carico rispetto ai paesi ad alto reddito. Tassi di morbilità e mortalità più elevati sono osservabili nell'Africa subsahariana e nell'Asia meridionale. Le evidenze mostrano che le malattie diarroiche colpiscono in modo sproporzionato luoghi con scarso accesso all'assistenza sanitaria, acqua potabile e servizi igienici e popolazioni a basso reddito od emarginate.

Sebbene il tasso di mortalità per diarrea tra gli adulti di età superiore ai 70 anni sia diminuito nel tempo, il numero di decessi non ha subito variazioni significative, suggerendo che l'invecchiamento della popolazione ha aumentato il carico di diarrea in questa fascia di età.

Tra le zoonosi, malattie causate da agenti trasmessi per via diretta o indiretta, dagli animali all'uomo, quelle veicolate da alimenti sono provocate dal consumo di cibi o acque contaminati da microrganismi patogeni. Nella popolazione umana, come riportato nel report annuale sulle zoonosi e sui focolai epidemici di malattie a trasmissione alimentare, prodotto dal Centro Europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) e l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), le infezioni da Campylobacter spp. si confermano la malattia più frequentemente riportata, cui seguono le infezioni da Salmonella spp., da Escherichia coli produttore di Shigatossina (STEC) e da Yersinia enterocolitica. Dagli annuali report europei si evidenzia una notevole variabilità di incidenza dei diversi patogeni tra i vari Stati membri, dipendente, oltre che da fattori geografico-ambientali (latitudine, clima, abitudini alimentari ecc.), dal numero di notifiche di malattia infettiva inviate.

Sebbene le sindromi diarroiche tendano, nella maggior parte dei casi ad una risoluzione spontanea, risultano comunque causa rilevante di ospedalizzazione nell'infanzia e occasionalmente possono dar seguito ad importanti sequele, quali batteriemie, artrite reattiva, megacolon tossico, perforazione intestinale o essere associate a complicanze invalidanti, quali malnutrizione, sindrome emolitico-uremica, sindrome di *Guillain Barrè*.

Per le malattie diarroiche esistono differenze geografiche e stagionali significative nella prevalenza della componente eziologica e vi è la possibilità di definire, in alcuni casi, entità nosologiche differenziate.

Le **enteropatie infettive differenziate**, pur con manifestazioni cliniche sovrapponibili, si contraddistinguono per a) le condizioni cliniche della popolazione coinvolta (immunodepressi, AIDS, malati affetti da malattie croniche debilitanti, tossicodipendenti, neonati, bambini e anziani), b) le condizioni ambientali che le favoriscono (**diarree dei viaggiatori**), c) le sedi in cui si manifestano (**enteropatie nosocomiali: AAD** ***antibiotic-***

*associated diarrea*; CDAD: *Clostridioides difficile associated disease*; AAPMC: *antibiotic-associated pseudo-membranous colitis*).

La diarrea dei viaggiatori è la malattia più comune legata ai viaggi e colpisce milioni di persone che si recano ogni anno nei paesi in via di sviluppo. La diarrea del viaggiatore è generalmente definita da 3 o più episodi di emissione di feci non formate nelle 24 ore accompagnate da un sintomo aggiuntivo (nausea, vomito, crampi addominali, febbre, sangue/muco nelle feci o urgenza fecale). Tali manifestazioni si sviluppano all'estero o entro 10 giorni dal ritorno. A causa della popolarità dei viaggi internazionali, l'incidenza di tale manifestazione è in aumento. Complessivamente, colpisce dal 10 al 40% dei viaggiatori e l'incidenza varia in base alla destinazione del viaggio, alla durata dell'esposizione e alla stagione del viaggio. Le destinazioni ad alto rischio includono Africa (con l'eccezione del Sud Africa), America meridionale e centrale, Asia meridionale e sud-orientale, Messico, Haiti e Repubblica Dominicana. La diarrea dei viaggiatori è solitamente acquisita dalla trasmissione oro-fecale dell'agente patogeno eziologico, tipicamente attraverso l'ingestione di cibo o acqua contaminata dalle feci. Gli insetti, in particolare le mosche e gli scarafaggi, sono vettori importanti per alcuni patogeni enterici di origine alimentare.

I batteri rappresentano fino al 90% dei patogeni identificati. *Escherichia coli* Enterotossigenico (ETEC) è l'agente patogeno più comune (30-60% di tutti i casi) cui seguono altri patotipi di *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp e *Yersinia enterocolitica*.

Gli agenti patogeni virali (norovirus, rotavirus, astrovirus, sapovirus e adenovirus enterico) possono essere responsabili fino al 10% dei casi di diarrea del viaggiatore, mentre i protozoi parassiti sono cause meno comuni.

In questi ultimi anni, grazie anche all'ausilio di mezzi diagnostici più avanzati, è aumentato in maniera significativa il numero di segnalazioni di infezioni miste o co-infezioni. Sul piano epidemiologico le co-infezioni vengono considerate potenzialmente sentinelle di meccanismi di contaminazione di origine 'ambientale' soprattutto mediate dall'acqua (es. incidenti con contaminazione acque nere/acque potabili) con rischio di esposizione diretta della popolazione, ovvero mediate da alimenti a loro volta irrigati o trattati con acque contaminate.

La maggior parte degli agenti patogeni batterici e virali ha un periodo di incubazione < 24 ore. La diarrea è acquosa nell'86% circa dei casi; tuttavia, può anche essere mucosa o sanguinolenta. I sintomi variano a seconda dell'agente patogeno causale. Anche a livello di diarrea dei viaggiatori si possono distinguere forme di entità lieve, tollerabili, che non interferiscono con le attività pianificate, di entità moderata, dolorosa e in grado di interferire con le attività pianificate, una forma grave, invalidante che impedisce completamente le attività pianificate.

## 4. SEGNI – SINTOMI

Sintomo caratteristico di un'enterite infettiva è la **diarrea** che può essere accompagnato da altri sintomi, solo in parte legati al microrganismo coinvolto: possono essere presenti nausea, vomito, dolore diffuso di tipo crampiforme, gonfiore, flatulenza e febbre. Nelle forme croniche possono associarsi deficit nutrizionali dovuti a malassorbimento. Nelle forme secretorie, oltre ad un volume fecale elevato, si ha una perdita consistente di liquidi. In questi casi, la liberazione di sostanze tossiche esogene in grado di provocare l'attivazione di cascate molecolari che portano all'aumento della permeabilità della cellula, con perdita di sodio, cloro, bicarbonato, acqua e, in misura minore, di potassio, può determinare disidratazione, acidosi metabolica ed alterazione del gap osmotico fecale. Nelle forme infiammatorie a carattere invasivo è presente un danno della mucosa intestinale con possibile invasione della lamina propria e la formazione di ulcerazioni che portano alla presenza di essudato e sangue nelle feci. Per la maggior parte dei pazienti che presentano diarrea acuta, i sintomi si risolvono prima che il risultato colturale sia disponibile e questo generalmente non va a modificare il trattamento.

## 5. EZIOLOGIA

La diarrea acuta è legata principalmente ad agenti infettivi (nel 70 % dei casi), pur riconoscendosi altre cause, quali diverticolite, intossicazioni da metalli pesanti, ischemia intestinale, allergie od intolleranze, l'uso di farmaci (lassativi, antiacidi, acido para-amino-salicilico, ecc) o l'assunzione di particolari alimenti (prodotti contenenti sorbitolo, mannitolo, ecc). Le forme di tipo cronico possono essere legate a condizioni di malassorbimento, alla sindrome del colon irritabile, a malattie infiammatorie intestinali (morbo di *Crohn*, rettocolite ulcerosa) o a morbo celiaco. Anche altre patologie possono associarsi a disturbi di tipo diarroico, come la malattia di *Whipple*, la sindrome da carcinoide, la sindrome di Zollinger-Ellison, i tumori o le alterazioni del sistema endocrino, i fecalomi, i deficit di lattasi e la sindrome dell'intestino corto.

Un ampio spettro di microrganismi è in grado di causare diarrea, con meccanismi patogenetici diversi (**vedi schede tecniche**). Accanto a patogeni enterici virali (*Rotavirus, Adenovirus, Norovirus*) e batterici (*Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus*) da tempo noti, se ne sono aggiunti progressivamente molti altri, quali *Aeromonas, Campylobacter, Arcobacter*, *Helicobacter*, (limitatamente alle specie *H.fenelliae* e *H.cinaedi*) *E.coli* enterotossigeni, enteroemorragici o enteoinvasivi, *Yersinia, Plesiomonas, Clostridium*, Astrovirus e Sapovirus), senza dimenticare le possibili eziologie parassitarie (Protozoi: *Giardia*, *Entamoeba, Cryptosporidium*; Elminti: *Strongyloides, Schistosoma*) e i Microsporidi. Come segnalato precedentemente, con la crescente disponibilità di pannelli diagnostici multiplex, in grado di rilevare simultaneamente diversi patogeni enterici, sono aumentate in questi ultimi anni le segnalazioni di coinfezioni il cui significato, da un punto di vista eziologico, risulta nella maggior parte dei casi di difficile interpretazione. La ricerca è necessaria per aiutare a interpretare il significato clinico di tali risultati.

Nonostante i miglioramenti in campo diagnostico, una percentuale di sindromi diarroiche rimangono ancora oggi ad eziologia sconosciuta. Da questo punto di vista, è opinione diffusa che per taluni microrganismi non considerati attualmente di particolare preoccupazione per la salute pubblica, il significato in infezioni umane possa essere riconsiderato alla luce dei risultati ottenuti dall'applicazione diffusa delle tecniche di Biologia Molecolare. L'importanza di alcuni batteri può essere attualmente sottovalutata

a causa dell'inadeguatezza dei metodi di rilevamento tradizionali. Ne sono esempi *Arcobacter species* oltre *A.buzleri*, *Bacteroides fragilis, Edwardsiella tarda, Escherichia albertii e Klebsiella oxytoca* (vedi schede tecniche).

## 6. ASPETTI PATOGENETICI

Da un punto di vista patogenetico, le gastroenteriti infettive possono essere differenziate in intossicazioni (da batteri o da miceti), tossinfezioni (da batteri) ed infezioni (da batteri, virus, protozoi e raramente da miceti). Nelle **intossicazioni** batteriche d'origine alimentare, la tossina, unica responsabile del quadro clinico, si trova preformata negli alimenti: in questo caso la moltiplicazione del microrganismo nell'alimento è necessaria per produrre quantità sufficienti di tossine ma, da un punto di vista patogenetico, la sua presenza non ha particolare rilevanza. All'origine di queste patologie risulta generalmente una conservazione inadeguata degli alimenti. Affinché l'intossicazione si possa manifestare, la tossina dovrà risultare termoresistente o l'alimento dovrà essere consumato senza precedenti trattamenti al calore. I microrganismi coinvolti in intossicazioni alimentari sono *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (che tuttavia non è associato a gastroenterite). La presenza di una tossina preformata giustifica il breve periodo d'incubazione che precede il manifestarsi della sintomatologia. Nelle **tossinfezioni** alimentari sono i microrganismi presenti negli alimenti o nell'acqua a penetrare nell'apparato digerente, dove avverrà la produzione di sostanze tossiche. Alla produzione in vivo della tossina spetta il ruolo patogenetico prioritario. Tra i principali agenti di tossinfezioni si riconoscono *Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Escherichia coli* ETEC-STEC. Per le intossicazioni e le tossinfezioni alimentari la sintomatologia (sindrome tossica) risulterà strettamente correlata all'azione specifica della tossina prodotta dal microrganismo (vedi schede tecniche). Nelle **infezioni**, i microrganismi (batteri, virus enterici, protozoi), una volta penetrati nel nostro organismo per via digestiva e in subordine alle capacità reattivali dell'ospite, determinano malattia grazie all'azione esercitata dai loro fattori di patogenicità, che spesso agiscono in maniera combinata.

Nella gastroenteriti batteriche intervengono **vari meccanismi patogenetici**: a) la produzione di enterotossine (*E.coli, V.cholerae, C.perfingens*) responsabili di un'alterazione dell'equilibrio elettrolitico a livello del lume intestinale, con eccessiva secrezione di fluidi nel piccolo intestino prossimale; b) il danneggiamento o distruzione, su base infiammatoria o citotossica, della mucosa dell'ileo o del colon (*E.coli, Shigella* spp., *Salmonella* spp.) mediante produzione di tossine citotossiche (citotossine), che provocano lesioni degenerative e necrosi dell'enterocita, con produzione di sangue e pus; c) l'invasione della mucosa con proliferazione intraepiteliale o nella lamina propria e conseguente distruzione diretta o indiretta dell'enterocita e con possibile penetrazione nel sistema reticoloendoteliale. Sia mediante l'invasione della mucosa che attraverso la produzione di tossine, un primo momento patogenetico corrisponderebbe ad un processo di adesività, che ha luogo a livello dello strato di muco, dell'epitelio intestinale e della matrice extracellulare a cui fa seguito l'adesione all'enterocita, con o senza lesioni dell'orletto a spazzola.

# 7. APPROCCIO DIAGNOSTICO

l'obiettivo principale di un soggetto con diarrea acuta è quello di liberarlo dai sintomi, reidratarlo (o prevenire la disidratazione) e potenzialmente prevenire la trasmissione di infezione ai contatti in famiglia o nelle comunità, aspetto, quest'ultimo, di particolare importanza in termini di sanità pubblica, per evitare la diffusione epidemica per contatto persona-persona nei contesti comunitari come scuole, asili, ospedali, RSA ovvero mediata da alimenti contaminati durate la loro preparazione dai cosiddetti '*food handlers*' cioè addetti alla ristorazione infetti.

Di contro la coprocoltura è indicata per pazienti con diarrea severa e prolungata, quelli con sintomi di malattia invasiva o quelli con una storia di complicanze associate alla malattia gastrointestinale. Ad esempio l'ACG (*American College of Gastroenterology*) raccomanda di routine la coltura di feci per pazienti con qualsiasi dei seguenti sintomi: diarrea severa o persistente, temperatura > 38°C, diarrea con sangue o la presenza di lattoferrina, leucociti o sangue occulto. Le raccomandazioni dell'IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) sono similari: raccomandano la coltura per pazienti con diarrea per oltre 1 giorno, in presenza di febbre, disidratazione, malattia sistemica, feci ematiche o una storia clinica che include patogeni batterici, per una diagnosi differenziale. Il ricorso ad accertamenti diagnostici tempestivi, anche costosi (test molecolari) è particolarmente indicato in pazienti appartenenti a categorie a particolare rischio di sviluppare conseguenze sistemiche gravi e potenzialmente fatali come la SEU e nei bambini piccoli (<5 anni) con diarrea ematica.

In aggiunta al valore per la cura del paziente, la coltura delle feci, così come le indagini molecolari, sono un mezzo importante per la Sanità Pubblica. Gli isolati da coprocolture sono impiegati per individuare e mappare epidemie a livello locale, nazionale ed internazionale. Il dilemma con alcuni dei più recenti metodi inclusi i test molecolari, è la mancanza dell'isolamento del microrganismo, necessario per le indagini di Sanità Pubblica.

## 7.1 Esame microbiologico delle feci

Tenuto conto del rapporto costo-beneficio, gli esami microbiologici su campioni di feci andrebbero eseguiti in presenza di un forte sospetto (clinico-anamnestico) di diarrea infettiva (diarrea acuta, protratta, del viaggiatore, associata a un possibile evento epidemico, in presenza di sangue e/o muco, in pazienti in età avanzata, in bambini sotto i 5 anni, in soggetti immunodepressi). L'esecuzione di indagini colturali su campioni di feci composte (non diarroiche) o in momenti successivi alla scomparsa della sintomatologia, andrebbe quindi scoraggiata, con l'eccezione dei casi di controllo su soggetti con precedenti riscontri colturali positivi per patogeni enterici, per escludere una condizione di "portatore asintomatico".

Attualmente la diagnosi di enterite di origine infettiva si ottiene attraverso le colture di campioni fecali. Fanno eccezione l'uso di sistemi di immunodosaggio antigenico e/o di sistemi molecolari per il rilevamento di enteriti ad eziologia virale e di tossine o componenti strutturali di *C.difficile*, di STEC e di *Campylobacter*. Parallelamente viene eseguita un'indagine microscopica e/o molecolare per la ricerca di parassiti (es. *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.*). In aggiunta raramente si ricorre alla diagnosi di laboratorio clinico per intossicazioni alimentari da *B.cereus, C.perfingens* e *S.aureus*: in genere in questi casi le feci, gli alimenti ed altri materiali biologici sono raccolti e inviati

ai Laboratori di sanità pubblica, così come agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali per gli alimenti di origine animale e vegetale.

## 7.2 Materiali – Modalità di raccolta e trasporto

Le **feci** diarroiche vanno raccolte dopo la loro emissione in quantità sufficiente (0,5-2 g., 5-10 mL). I campioni andrebbero raccolti prima dell'assunzione di antimicrobici. Dovrebbero essere fornite adeguate istruzioni sulle corrette modalità di raccolta dei campioni. Il paziente deve raccogliere il materiale in recipienti puliti e trasferirlo in contenitori con tappo a vite, correttamente contrassegnati (nome, cognome, data di nascita). I campioni non devono essere contaminati con urine, con l'acqua dei sanitari o con carta igienica (può contenere sali di bario), perché potrebbero interferire con il risultato della coltura.

In alternativa alle feci può essere utilizzato il tampone fecale: tampone con terreno di trasporto (*Carey-Blair*) intinto nelle feci. I tamponi rettali sono generalmente considerati meno sensibili delle feci per la coltura, ma, per alcune popolazioni di pazienti (neonati e bambini piccoli) o per la ricerca di alcuni microrganismi, possono essere considerati accettabili. In questo caso l'indagine mediante tampone rettale va riservata alla ricerca di *Shigella*, *Salmonella* (portatori) ed *E.coli* shiga-produttori (STEC). I tamponi rettali devono essere inseriti nel retto, per circa 1cm, accuratamente ruotati, in modo che le feci possono essere raccolte e visibili sul tampone. Il tampone deve essere quindi posto in mezzo di trasporto e inviato al laboratorio.

Per l'esame colturale di batteri del genere *Vibrio*, si può procedere, in fase acuta di infezione, sia al prelievo diretto delle feci con un idoneo contenitore sterile, sia al prelievo mediante l'uso di tamponi sterili, avendo cura di prelevare anche il muco presente sulle pareti del retto e non limitarsi alla superficie perianale. Nei pazienti convalescenti o in quelli in fase asintomatica è preferibile il prelievo delle feci intere rispetto ai tamponi.

I campioni raccolti con tampone non sono da considerarsi idonei per la ricerca di tossine e/o antigeni o per ricerche parassitologiche (ad eccezione del test per la ricerca di *Enterobius vermicularis*, per il quale, oltre al tradizionale scotch test, è consentito anche l'utilizzo di tampone perianale) (si rimanda al percorso diagnostico sulle parassitosi intestinali).

Le feci dovrebbero pervenire in laboratorio entro 1-2 ore dall'emissione, altrimenti andrebbero conservate a 4-6°C per ≤ 24 ore (soluzione salina tamponata, terreno di trasporto *Cary-Blair/Stuart/Amies*). Oltre tale limite i campioni andrebbero mantenuti a –70°C.

Nel sospetto di infezione di microrganismi del genere *Vibrio*, i campioni andrebbero inoculati su terreni colturali al più presto, lasciando trascorrere il minor tempo possibile tra prelievo e semina: la vitalità di *Vibrio* è assicurata da un pH alcalino, tipico delle feci liquide, evitando la disidratazione. Quando è previsto intercorra un certo periodo di tempo tra il prelievo e la semina, il tampone rettale o il materiale fecale devono essere posti in acqua peptonata alcalina con 1 - 3% di NaC1 (per una semina ritardata al massimo di 8 ore) o nel terreno semisolido di trasporto di Cary and Blair (per un tempo di conservazione di più di 8 ore), che assicura una sopravvivenza di *Vibrio* spp. per più 4 settimane.

Nel sospetto di infezione extraintestinale da *Salmonella*, oltre a campioni fecali, andrebbero raccolti campioni di sangue ed urina; nel sospetto di febbre tifoide, campioni di sangue andrebbero raccolti nella prima settimana di febbre e campioni fecali e di urina le settimane successive. Al campione deve essere allegato un modulo di richiesta che preveda, oltre i dati anagrafici, la raccolta di tutti i dati clinico-anamnestici che possano orientare l'iter diagnostico. In presenza di un sistema gestionale informatizzato dovrà essere prevista una adeguata scheda informatica di accettazione.

In questo contesto, si inserisce la tecnologia dei dispositivi di trasporto e prelievo LBM (*Liquid Based Microbiology*): essi rappresentano un sistema di prelievo innovativo (sonde floccate) abbinato ad uno specifico terreno di trasporto/arricchimento (a seconda della natura del campione da raccogliere per le successive indagini di Laboratorio), pronto all'uso ed in fase liquida, all'interno di un unico contenitore. La combinazione tra floccati e sistema di trasporto liquido offre significativi vantaggi: a) capacità di preservare la vitalità dei patogeni enterici durante la conservazione ed il trasporto dei campioni fecali da sottoporre a coltura; b) la possibilità di standardizzare la semina dei campioni utilizzando un terreno di trasporto liquido abbinato o meno ad un sistema automatico; c) la possibilità di un utilizzo sia per test colturali sia per la ricerca di antigeni e acidi nucleici.

La campionatura va eseguita appena possibile, dopo l'esordio della sintomatologia e comunque in una fase acuta d'infezione. L'analisi su più campioni (2-3) non andrebbe generalmente prevista (nel 94% dei casi l'agente eziologico viene riconosciuto dal primo campione), se non nel caso di sospetta infezione parassitaria o nel caso di una persistente sintomatologia in presenza di un precedente riscontro colturale negativo.

Regola dei 3 giorni. È ampiamente documentato che campioni fecali di pazienti che sviluppano diarrea dopo tre giorni di ospedalizzazione, hanno una probabilità molto bassa di risultare positivi se sottoposti ad indagine microbiologica. Per questo motivo viene data indicazione di non sottoporre ad esame colturale un campione fecale di paziente ospedalizzato da più di 3 giorni o di segnalarne l'inappropriatezza prescrittiva. La regola dei 3 giorni non va tuttavia presa in considerazione in alcune condizioni: I) pazienti ricoverati con diarrea o che presentano diarrea nei primi 3 giorni dopo il ricovero; II) diarrea nosocomiale riscontrata in pazienti da 65 anni in su con malattia persistente d'organo che determina alterazione funzionale permanente, soggetti HIV positivi o neutropenici; III) pazienti che possano essere coinvolti in un possibile *cluster* epidemico all'interno della struttura. In relazione alle condizioni sovracitate, per una corretta gestione dei campioni, risultano necessarie informazioni cliniche di accompagnamento ai campioni.

Anche per la ricerca di *C.difficile* andrebbero adottate misure restrittive sull'idoneità dei campioni: il test non andrebbe eseguito su pazienti asintomatici, su bambini sotto 1 anno di vita (forte colonizzazione), su feci formate, ecc. la ripetizione del test su campioni negativi andrebbe scoraggiata se non esclusa. Molti laboratori hanno sviluppato inoltre criteri di esclusione per campioni presentati entro un definito intervallo di tempo da un esito positivo, in quanto molti pazienti possono rimanere colonizzati da C. difficile dopo trattamento con successo.

Per le procedure analitiche su campioni fecali vanno considerati livelli di contenimento 2 per trattamenti di routine e livelli di contenimento 3 se si sospetta la presenza di: *Salmonella typhi* e *paratyphi* A, B, C*; E.coli* STEC; *Shigella dysenteriae*.

## 7.3 Indagini- Esame microscopico/Leucociti fecali

In presenza di diarrea persistente o ricorrente, l'esame microscopico, per il riscontro di polimorfonucleati (PMN), o l'immunodosaggio per la determinazione di lattoferrina (Leuco-test), possono ritenersi utili per la conferma di una diagnosi di diarrea infiammatoria o invasiva. La ricerca di PMN va riservata a campioni di feci fresche o conservate in contenitori per ricerca di parassiti. La presenza di lattoferrina fecale può essere quantificata risultando generalmente a livelli più alti nelle diarree legate a *Shigella, Salmonella*, *Campylobacter jejunii* o *C.difficile*. Per l'elevato potere predittivo negativo, la ricerca di lattoferrina fecale può ritenersi un utile *test* di *screening* per una diagnosi presuntiva di enterite batterica infiammatoria o per una diagnosi d'idoneità del campione per indagini colturali.

## 7.4 Indagini- Esame colturale

La batteria di terreni primari utilizzati per le colture di campioni fecali varia da Laboratorio a Laboratorio in relazione ai microrganismi routinariamente ricercati. Le indagini di base dovrebbero prevedere la ricerca di *Salmonella, Shigella*, *Campylobacter* e STEC. Dovrebbero quindi essere impiegati substrati per l'isolamento di *Salmonella, Shigella* e *Campylobacter*; si dovrebbe prevedere un terreno per l'isolamento di STEC 0157 e/o un brodo di arricchimento per un test sulla presenza di Shiga-tossine.

## 7.5 Indagini- Esame colturale

*Modalità*

*Semina diretta del campione*: il materiale fecale, proveniente da un campione di feci o in alternativa da un tampone fecale, va sospeso in soluzione fisiologica (diluizione 1:10 per ridurre la quantità di flora contaminante); alcune gocce di sospensione fecale vanno poste su piastra di coltura, occupando 1/3 della superficie, procedendo alla semina della restante superficie secondo le modalità di una sottocoltura (strisce parallele), mediante ansa sterile.

*Semina con arricchimento* (quando prevista): un determinato volume di feci (corrispondente a quello di un pisello) viene sospeso in brodo di arricchimento (rapporto 1:5); dopo incubazione (≤6 ore), si procede a sottocoltura mediante semina su terreni solidi appropriati con ansa sterile. L'utilizzo di un arricchimento ha l'obiettivo di creare condizioni favorevoli alla crescita di un determinato microrganismo, in base alle sue esigenze nutrizionali, inibendo contemporaneamente la crescita di altri microrganismi, affinché non "interferiscano" sull'isolamento. Le procedure di arricchimento, più che in forme acute in atto, sono quindi indicate quando si ipotizzano cariche microbiche basse (soggetti convalescenti, portatori asintomatici) per incrementare il numero di cellule disponibili o per rivitalizzare quelle in danno subletale.

*Semina su membrana filtrante*: un volume di feci determinato (pisello) viene sospeso in brodo (Brucella brodo) o in soluzione fisiologica e omogeneizzato; 4-5 gocce di sospensione vengono deposte sopra una membrana filtrante (acetato di cellulosa) sterile (pori da 0,45-0,65mm), appoggiata su una piastra di coltura con terreno non selettivo. Dopo una breve incubazione a 37°C per 45', si procede alla rimozione del filtro e all'incubazione definitiva per 24-48 ore a 37°C in atmosfera di microaerofilia. L'utilizzo della tecnica con membrane filtranti è indicata per la ricerca e l'isolamento di microrganismi del genere *Campylobacter* e di generi correlati.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

## *7.6* Indagini- Esame colturale.

### *Isolamento di Salmonella-Shigella*

Isolamento tradizionale di *Salmonella* spp. può comportare un pre-arricchimento non selettivo (acqua peptonata e brodo di lattosio) per facilitare il recupero di cariche subottimali di *Salmonella* o di cellule subletalmente danneggiate, seguito da una fase di arricchimento selettivo e successiva semina su agar selettivi.

*Impiego di terreni moderatamente selettivi: si tratta di terreni in grado di inibire la crescita della maggior parte degli Enterobatteri*, facilitando la crescita di *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (Hektoen enteric, Xylose Lysine Desoxycholate, Salmonella-Shigella agar).

*Impiego di terreni cromogenici*: si tratta di substrati che ottimizzano l'isolamento selettivo e la differenziazione di batteri del genere *Salmonella*. La selettività del terreno è garantita da una miscela di sostanze inibenti che impediscono la crescita di batteri Gram positivi e in parte di Gram negativi; la differenziazione tra i ceppi di *Salmonella* e di non-salmonella è ottenuta attraverso la presenza nel terreno di substrati cromogenici sui quali agiscono attività enzimatiche specifiche in grado di produrre metaboliti colorati. Il valore di terreni cromogeni è stato dimostrato in numerosi studi che riportavano una migliore sensibilità e specificità rispetto ai tradizionali mezzi di selettivo/differenziali per il recupero di Salmonella, Shigella; questi substrati sono tuttavia più costosi di media tradizionali.

*Impiego di terreni di arricchimento*: terreni liquidi utili per inibire la crescita del normale microbiota nelle prime ore d'incubazione, aumentando le probabilità di rilevare patogeni in bassa carica batterica (Selenite, Selenite cystine, Rappaport-Vassiliadis, Tetrathionate, Kauffmann Muller Tetrathionate broth). Selenite broth, per la presenza di sodio selenito, presenta elevata tossicità per *E.coli* ma non per la maggior parte dei microrganismi del genere *Salmonella*. Alcuni stipiti di *Shigella* sono inibiti nella stessa misura di *E.coli*: per l'isolamento di *Shigella* è quindi raccomandato l'uso di un brodo d'arricchimento meno selettivo (GN broth). Il terreno in polvere, a differenza dei prodotti pronti all'uso (in provetta o flacone), contenendo sodio biselenito, che è classificato come nocivo (Xn), ai sensi della legislazione vigente, richiede la consultazione delle schede di sicurezza, per la protezione delle vie respiratorie. Tetrathionate broth e soprattutto la forma modificata Kauffmann Muller Tetrathionate broth sono terreni d'arricchimento per *Salmonella* spp.: la presenza di sali biliari ritarda la crescita di altri batteri gram-negativi e inibisce quella dei gram-positivi. A differenza dei brodi a base di selenite quelli con tetrationato consentono la crescita di *Shigella* spp.

### *Isolamento di Campylobacter*

L'isolamento di *Campylobacter* e di batteri di generi correlati dipende dagli agenti antimicrobici presenti nei substrati colturali (*C.upsaliensis*, *H.fennelliae* sono sensibili alla cefalotina), dall'incubazione in ambiente microaerofilo (5% di O2, 10% di CO2 e l'85% di N2), alla temperatura di 42°C, che inibisce la crescita del normale microbiota. Possono essere utilizzati differenti terreni selettivi: Skirrow, Karmali, Blaser Wang, Butzler, Preston, Bolton, CCDA (carbone-cefoperazone-desossicolato agar senza sangue). È recente l'introduzione di substrati cromogenici, per l'isolamento e la differenziazione di *Campylobacter* da campioni clinici fecali. In alcune esperienze, il terreno cromogenico CASA si è dimostrato altamente efficiente per il recupero di *C. jejuni* e *C. coli* da campioni clinici e recentemente è stato introdotto un altro terreno cromogenico solido (CAMPYAIR)

che supporta la crescita di isolati di *Campylobacter* entro 48 ore dall'incubazione in atmosfera aerobica. Possono anche essere impiegate procedure di arricchimento mediante substrati liquidi (Campy-THIO): tali procedure sono raccomandate per campioni clinici quando si sospetta la possibilità di basse cariche microbiche vitali (portatori, pazienti post-sintomatici o trattati con antibiotici) o per campioni alimentari. Possono essere impiegati metodi d'isolamento alternativi: mediante membrane filtranti è possibile ottenere l'isolamento di specie di *Campylobacter* incapaci di crescere a 42° C o su terreni selettivi.

### *Isolamento di Aeromonas/Plesiomonas.*

*Aeromonas* e *Plesiomonas,* responsabili d'infezione con diarrea acquosa (simil-colerica), crescono sui normali terreni differenziali; l'uso di terreni selettivi (*Aeromonas* selective agar, CIN agar modificato) può facilitarne l'isolamento; per forme subacute o croniche può essere utile una procedura d'arricchimento (acqua peptonata, pH 8.5).

### *Isolamento di Vibrio spp.*

*Vibrio* cresce bene sui normali terreni differenziali, anche se l'uso di terreni selettivi (TCBS selective agar) può facilitarne l'isolamento. Il TCBS (tiosolfato- I citrato-sali biliari-saccarosio) si è dimostatro un eccellente terreno colturale per l'isolamento di *Vibrio,* in particolare per V. *cholerae,* V. *parahaemolyticus* e *V.vulnificus.* Nell'impossibilità di semine immediate, è consigliabile l'uso di terreni di trasporto (Cary-Blair) o di acqua peptonata (pH 8), che fornisce un ottimo substrato di arricchimento per V. *cholerae* solo per periodi di incubazione che non eccedono le 6-8 ore; un brodo di arricchimento con tellurito con sali biliari (pH 9,0) può essere maggiormente selettivo consentendo incubazioni anche *ovemight*.

### *Isolamento di Yersinia spp.*

*Yersinia* cresce bene sui normali terreni differenziali, anche se l'uso di terreni selettivi (CIN: Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar) può facilitarne l'isolamento; sono raccomandate basse temperature di incubazione per l'isolamento primario che è raccomandato solo in caso di sospetto clinico. L'uso di terreni cromogenici (CHROMAgar Yersinia), di recente introduzione, può facilitare l'identificazione presuntiva di colonie sospette, riducendo il numero di test di conferma. Le procedure di arricchimento (arricchimento a freddo o alcalino) possono facilitare il rilevamento di basse cariche microbiche nelle fasi di convalescenza della malattia o in soggetti asintomatici.

### *Isolamento e l'identificazione di Escherichia coli STEC*

L'isolamento e l'identificazione di Escherichia coli STEC mediante metodi di coltura, con l'eccezione di ceppi O157, risulta piuttosto problematico. Per tale motivo l'esame colturale viene indicato in campioni risultati positivi ad un test di screening molecolare per la presenza dei geni *stx* codificanti per le Shiga-tossine. Per l'isolamento di *E.coli* O157:H7, responsabile di coliti emorragiche legate alla produzione di una tossina citotossica, possono essere utilizzati terreni differenziali (McConkey + sorbitolo, terreno cromogenico per *E.coli* O157). I terreni per rilevare stipiti di *E.coli* O157sorbitolo-negativi includono Sorbitol MacConkey agar (SMAC) e una variante di questo contenente cefixime e tellurito (CT-SMAC). Le colonie sorbitolo-negative di E. coli appaiono incolori su questi due substrati, ma CT-SMAC agar ha il vantaggio di eliminare molta flora enterica che cresce su agar SMAC. CHROMagar O157 rileva il sierogruppo O157 mentre CHROMagar STEC rileva sia O157 che altri sei sierogruppi prevalenti di STEC (O26, O45, O103, O111, O121,

O145). Generalmente è preferibile un'incubazione in brodo di arricchimento (16-24 ore a 37°C) piuttosto che la semina diretta. Data l'ormai accertata pluralità dei sierotipi dei ceppi che causano infezioni in Italia, l'orientamento è quello di ricorrere comunque alla dimostrazione diretta della presenza nelle feci dei geni *stx1* e *stx2* codificanti le Shiga tossine mediante test molecolari basati su *real time* PCR. Per il rilevamento di *stx1* e *stx2* è auspicabile l'utilizzo di un brodo di arricchimento, tipicamente brodo GN, inoculato e incubato a 37°C per una notte.

## 7.7 Indagini- Esame colturale. Terreni di coltura nel sospetto di tossinfezione

### *Tossinfezioni da B.cereus e S.aureus*

Nelle tossinfezioni da *B.cereus* e in quelle da *S.aureus*, il germe va ricercato nel vomito, nelle feci ed eventualmente nel cibo residuo mediante terreni selettivi (Mannitol salt agar, PEMBA: Polymxxin Egg Yolk Mannitol Bromothymol blue Agar). L'indagine è completata da colture quantitative sulle feci. Più recentemente, sono stati convalidati metodi alternativi per l'enumerazione di presunti *B. cereus* negli alimenti. Tali metodi utilizzano terreni cromogenici selettivi, rispettivamente COMPASS e BACARA. Dopo l'idrolizzazione del substrato cromogenico, le colonie di *B.cereus* appaiono in verde (COMPASS) o in arancione circondate da un alone opaco (BACARA). Questi agar selettivi inibiscono la maggior parte della microflora di fondo e consentono una facile identificazione.

L'identificazione delle colonie sospette va confermata biochimicamente o mediante spettrometria. Gli stafilococchi isolati dovrebbero essere sottoposti a tipizzazione fagica e a test per la capacità di produrre tossina, (laboratorio di riferimento). Gli stipiti produttori di tossina possono essere identificati come causa di intossicazione se si isola lo stesso fagotipo nelle feci e negli alimenti. Esistono kits per la ricerca dell'enterotossine A, B, C, D, mediante agglutinazione passiva inversa al lattice (RPLA). La conferma di un coinvolgimento del microrganismo in episodi di tossinfezioni è subordinata alla dimostrazione della presenza della tossina nei materiali organici (feci, vomito) e, dove possibile, negli alimenti sospetti.

### *Tossinfezione alimentare da C.perfringens*

La tossinfezione alimentare da *C.perfringens* può essere diagnosticata con colture quantitative su terreni selettivo-differenziali come TSC-EYA (*C.perfringens* agar base + Tryptose Sulfite Cycloserine agar + Egg Yolk emulsion) in anaerobiosi su alimenti o feci. L'inoculazione diretta di campioni di feci neonatali su TSC-EYA fornisce un'identificazione presuntiva sensibile e rapida di C.perfringens e può facilitare il recupero nelle indagini successive. Dopo 24-48 ore a 35°C, colonie nere, lecitinasi-positive, presuntivamente identificate come C.perfringens, vengono confermate biochimicamente, spettrometricamente o mediante sequenziamento del gene 16S rRNA. Per facilitare il recupero di Clostridi, i campioni fecali possono essere sottoposti a shock termico o a pretrattamento con etanolo, prima di essere seminati su terreno selettivo.

## 7.8 Indagini- Esame colturale. Terreni di coltura nel sospetto di diarrea da antibiotici

### *Isolamento di Clostridioides difficile*

La coltura per *C.difficile*: prevede la semina del campione su terreni selettivi/differenziali. Esistono terreni selettivi specifici per la crescita di CD come CCFA (cicloserina cefoxitina fruttosio agar) nei quali sospensioni fecali possono essere direttamente inoculate e incubate per 48 ore in anaerobiosi. La preincubazione in anaerobiosi del terreno può incrementare l'isolamento di clostridi. Il pretrattamento delle feci mediante shock etanolico (volumi uguali di etanolo e feci mescolati per 1 ora) aumenta la sensibilità della coltura, favorendo la crescita di *Clostridioides*. Studi più recenti hanno dimostrato che l'inoculo di un brodo di arricchimento che contiene taurocolato, antibiotici, carboidrati e lisozima migliora il recupero di *C. difficile* senza la necessità di pretrattamento con calore o alcool. Sempre recentemente è stato dimostrato che l'uso di terreno agar cromogenico selettivo di nuova concezione, consente, con o senza tecniche di arricchimento, il rilevamento di *C. difficile* in modo rapido e sensibile. Sul terreno cromogenico le colonie di *C. difficile* appaiono nere con uno sfondo chiaro. La produzione di tossine deve tuttavia essere ulteriormente accertata con altre metodologie.

Nel tempo sono stati proposti numerosi algoritmi diagnostici (a 2 0 3 step) (vedi flow chart) per la diagnosi di *AAD*: in alcuni di questi è prevista l'indagine colturale. Nei centri che la eseguono, la coltura è riservata o ai campioni risultati positivi alla ricerca della tossina, per finalità epidemiologiche o per saggi di sensibilità, o a quelli risultati negativi alla ricerca della tossina per un ulteriore saggio di tossigenicità, ove persista il sospetto clinico.

## 7.9 Indagini-Emocoltura-Sierodiagnosi

In caso di sospetta febbre enterica (tifoide, paratifoide) le indagini vanno integrate con emocolture e sierodiagnosi di Widal

## 7.10 Indagini- Identificazione

In base ai terreni utilizzati, le colonie sospette vanno sottoposte a identificazione biochimica o spettrometrica (*Salmonella, Shigella*, *Campylobacter*, *Aeromonas, Plesiomonas, Vibrio, Yersinia*) e a conferma sierologica mediante antigeni somatici. I laboratori di riferimento regionale potranno completare la caratterizzazione degli stipiti mediante una sierotipizzazione con antigeni flagellari. Nel caso di *Salmonella* spp., ad esempio, le colonie identificate biochimicamente e confermate sierologicamente (antisiero polivalente) vengono sottoposte a tipizzazione sierologica secondo lo schema aggiornato di *Kauffmann-White* che prevede la caratterizzazione di una fase somatica (gruppi A-E) e di una flagellare (fasi 1 e 2).

*Identificazione di E. coli.* Non ci sono specifici *test* biochimici che consentono di differenziare *E.coli* enteropatogeno da quelli non patogeni. La tipizzazione di questi microrganismi è riservata esclusivamente a Centri di riferimento e si basa su metodi fenotipici (sierotipizzazione) e molecolari. Alcuni sierotipi sono più frequentemente associati con EPEC, ETEC, EIEC, EHEC e EAEC ma per una identificazione definitiva si deve procedere, su campioni di feci o su colonia, alla determinazione di specifici fattori di patogenicità (fattori di adesività, entero-citotossicità, invasività, ecc.) indagini, per lo più molecolari, attualmente per lo più riservate a Laboratori di riferimento.

Negli ultimi anni ha preso sempre più spazio, in alternativa all'identificazione biochimica, quella su base spettrometrica. I dati di letteratura confermano gli ottimi livelli di *performance* dei sistemi spettrometrici di uso commerciale nell'identificazione di patogeni enterici a livello di genere e in parte nella differenziazione di specie. Va

precisato che con gli attuali sistemi non è possibile differenziare *Shigella species* da *Escherichia coli* e parimenti individuare *Escherichia coli* dotati di caratteristiche di enteropatogenicità.

## *7.11* Indagini- Ricerca antigeni/tossine

### *C.difficile*

Determinazione dell'antigene comune (glutammato deidrogenasi - GDH) proteina non tossinica associata a *C.difficile*. *Test* dotato di buona sensibilità che, in caso di positività, richiede conferma con un *test* più specifico per la dimostrazione della presenza di stipiti produttori di tossina. Può dare reazioni crociate con *P.anaerobius* e *C.sporogenes*. Ricerca delle tossine A/B con metodiche immudoenzimatiche (EIA) o immunocromatografiche (IC): sistemi mirati esclusivamente all'evidenziazione delle tossine A/B di *C. difficile* e che consentono di ottenere un risultato in meno di 1 ora; non vanno più utilizzati *test* che rilevano la sola tossina A per la presenza di ceppi tossinogenici produttori esclusivamente di tossina B. Rispetto al *test* antigenico, il rilevamento delle tossine risente maggiormente delle modalità di conservazione del campione: le tossine si degradano rapidamente se il campione non viene conservato a 2°-8°C. Sebbene la maggior parte degli EIA per le tossine abbia un'eccellente specificità, la loro sensibilità varia ampiamente dal 40% al 100%. A causa delle limitazioni nella sensibilità analitica, gli EIA per le tossine di *C. difficile* come test autonomi non sono considerati un metodo accettabile per la diagnosi di CDI. La mancanza di EIA sensibili per le tossine ha portato allo sviluppo dei test ELISA (*digital enzyme-linked immunosorbent assay*) ultrasensibili per le tossine A e B con la quantificazione delle tossine nelle feci. ELISA digitale consente immunodosaggi più sensibili rispetto a quelli possibili utilizzando gli EIA convenzionali, migliorando l'accuratezza diagnostica clinica non rilevando C. difficile colonizzante, senza produzione di tossina o con una produzione minima di tossina.

### *Salmonella*

Test immunologici che impiegano specifici anticorpi mono o policlonali che si legano con antigeni somatici o flagellari sono stati ampiamente utilizzati per il rilevamento di *Salmonella* spp. in una varietà di matrici campione. I test immunologici includono test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), test di agglutinazione al lattice, immunodiffusione e immunocromatografia (*dipstick*). Questi metodi tuttavia, presentano alcuni potenziali limiti per il rilevamento di *Salmonella*, tra cui un tempo di arricchimento più lungo per ottenere il numero appropriato di cellule, reazioni incrociate con antigeni strettamente correlati, variazione dell'antigene, limiti di sensibilità per alcune matrici di campioni e cellule stressate e costi elevati per l'automazione.

### *E.coli*

Esistono in commercio immunodosaggi per il rilevamento di antigeni di O157 e H7 da approntare direttamente dalle feci o da brodi di arricchimento colturali. L'attuale ridotta sensibilità e lo scarso valore predittivo negativo ne limitano l'impiego diagnostico. Possono fornire viceversa un valido aiuto nella diagnosi di infezione da VTEC test immunoenzimatici, immunocromatografici ma soprattutto test molecolari basati sulla PCR/real time per la ricerca nelle feci delle Shiga tossine o dei geni che le codificano. Alcuni test sono anche approvati FDA per l'uso direttamente sulle feci, senza arricchimento in brodo, ma le prestazioni variano tra i produttori. Nelle raccomandazioni

pubblicate dal CDC i campioni di feci di pazienti con diarrea acquisita in comunità e in pazienti con possibile HUS, i test molecolari basati sulla PCR/ Real Time, sufficienti per una diagnosi microbiologica, possono essere associati ad esame colturale con terreni selettivi o differenziali. Eventuali brodi di arricchimento con test positivo per *Stx* dovrebbero essere inoltrati ad un Centro di Sanità Pubblica locale o statale per l'isolamento e la caratterizzazione.

### *Campylobacter*

Sono disponibili numerosi *tests* immunoenzimatici (EIA) o immunocromatografici (IC) per la determinazione di antigeni del *cell-wall* di *Campylobacter* nelle feci con sensibilità specie-variabile. I test antigenici non differenziano *C.jejunii* da *C.coli*. I test EIAs sono più rapidi rispetto alla coltura ma è possibile che i risultati positivi non vengano confermati da altri metodi. In alcune recenti osservazioni indirizzate al confronto fra differenti metodologie (EIA, coltura, PCR) vengono riportati in percentuali variabili, accanto a situazioni di false positività di dosaggi immunologici, casi EIA/IC positivi con coltura negativa riconducibili a specie non *jejuni/coli*, confermate con sistemi molecolari. Il Valore Predittivo Negativo (VPN) della maggior parte degli immunodosaggi risulta comunque molto alto. Il Valore Predittivo Positivo non ottimale di questi immunodosaggi, ha comportato l'indicazione della necessità di una conferma di un risultato positivo con un sistema molecolare o mediante un sistema colturale che consenta la crescita di specie non termofile o a crescita difficoltosa. Da pubblicazioni più recenti risulterebbe tuttavia l'introduzione di sistemi immunoenzimatici o immunocromatografici più sensibili e specifici da giustificarne l'utilizzo come metodo di screening per il rilevamento di *Campylobacter spp*.

### *V.cholerae*

Esistono sistemi immunoenzimatici, immunocromatografici per il rilevamento di antigeni specifici di *V. cholerae* e sistemi di agglutinazione passiva inversa al lattice (RPLA) per la determinazione dell'enterotossina. Test diagnostici rapidi (RDT) di più recente introduzione, rappresentano strumenti promettenti per la diagnosi precoce del patogeno *V. cholerae* 01/0139, anche in aree remote dove le risorse di laboratorio sono scarse. I test RDT possono essere considerati uno strumento investigativo in *setting* epidemici di colera poiché le tecniche di coltura sono spesso difficili da utilizzare, o per la sorveglianza epidemiologica da parte delle autorità sanitarie pubbliche.

### *S.aureus*

Rilevamento di enterotossina. Esistono *kits* per la ricerca dell'enterotossine A, B, C, D, mediante agglutinazione passiva inversa al lattice (RPLA). Il riscontro di enterotossina nel vomito (non sono attualmente disponibili kit per la ricerca della enterotossina nelle feci) è comunque di limitato valore diagnostico.

### *C.perfringens*

Rilevamento di enterotossina. La ricerca dell'enterotossina nelle feci è considerato l'approccio più valido. Esistono *kits* per la ricerca dell'enterotossina prodotta da *C.perfringens*, mediante agglutinazione passiva inversa al lattice (RPLA) o tecniche immunoenzimatiche (ELISA).

## 7.12 Indagini- saggio di citotossicità

*C.difficile*.

Il saggio di citotossicità su colture cellulari da filtrato fecale per il rilevamento della tossina B (TCCA: *tissue colture cytotoxin assay*,) è ancora considerato il "*gold-standard*" per la diagnosi di ICD. Sebbene il test sia considerato un metodo di riferimento, la sensibilità clinica è <90%. Ciò è probabilmente dovuto a una varietà di fattori preanalitici e alla difficoltà con le prestazioni e l'interpretazione del test. Il test non è utilizzabile nella pratica clinica per i tempi di risposta (TAT>48 ore) e per l'elevato costo (linee cellulari) ed è riservato a laboratori di riferimento specializzati.

## 7.13 Indagini- sistemi molecolari

In anni recenti molti sistemi molecolari basati sull'amplificazione degli acidi nucleici (NAAT), volti al rilevamento di patogeni enterici o a particolari *markers* genetici espressi nelle isole di patogenicità, sono stato oggetto di ricerca e di valutazioni scientifiche. Per alcuni microrganismi, come nel caso di *C.difficile*, i sistemi molecolari sono stati validati, approvati dall'FDA, rendendosi disponibili commercialmente e consentendo l'inserimento in algoritmi diagnostici condivisi.

*C.difficile,* sono disponibili test in *real-time* PCR in grado di rilevare, a partire dal campione, geni della tossina B e di quella binaria. La possibile automazione delle fasi di estrazione, amplificazione e lettura, insieme a TAT ridotti, ne fanno il *test* diagnostico ideale. I costi ancora elevati suggeriscono l'impiego dei sistemi molecolari come test di conferma in seguito a screening con sistemi immunoenzimatici (GDH e tossine A/B), anche in considerazione della possibile sovradiagnosi di CDI per il rilevamento di portatori asintomatici di *C. difficile* tossinogenico in assenza di produzione effettiva di tossine. Sempre in merito a *C.difficile*, va segnalata la disponibilità in commercio anche di sistemi basati sulla tecnologia di amplificazione isotermica mediata da loop (LAMP), che richiedono attrezzature meno costose, e diverse piattaforme sindromiche multiplex in grado di rilevare i principali agenti causali della diarrea infettiva tra batteri, virus e protozoi.

*E.coli*: sono sati sviluppati sistemi molecolari di rilevamento di geni che codificano le Shiga-tossine direttamente nei campioni fecali o previo arricchimento in brodo. Questi sistemi potenzialmente molto sensibili e da ritenersi test di elezione, possono garantire diagnosi rapide in grado di contribuire ad un approccio clinico-terapeutico più efficace e tempestivo soprattutto in quelle situazioni a maggior rischio di complicanze (HUS).

*Shigella*, alcuni studi avrebbero dimostrato che il rilevamento di *Shigella* mediante PCR quantitativa (qPCR), utilizzando il gene ipaH come marcatore per il rilevamento di Shigella, possa comportare un aumento della prevalenza rispetto ai risultati ottenuti utilizzando metodi convenzionali, pur considerando tuttavia che il medesimo target molecolare (*ipaH*) viene utilizzato per il riconoscimento di *E.coli* enteroinvasivo, a sua volta responsabile di focolai epidemici in Europa. In aggiunta, rispetto alla natura binaria di presenza o assenza della coltura di Shigella, qPCR può fornire un'indicazione dell'entità del patogeno all'interno di un campione, con la teorica possibilità di creare un *cutpoint* clinicamente rilevante.

*Salmonella*, negli ultimi anni sono stati sviluppati saggi molecolari per il rilevamento di *Salmonella* da varie matrici organiche in relazione ai vantaggi in termini di sensibilità, specificità e inclusività rispetto a metodi tradizionali. Diversi metodi convalidati sono già

in uso nell'industria alimentare e attualmente è disponibile una varietà di strumenti commerciali in grado di identificare e quantificare la *Salmonella* negli alimenti, nelle cellule e nell'acqua. Un'alternativa più economica alle tecniche in RT-PCR è l'amplificazione isotermica mediata da *loop* (LAMP). Grazie alla sua facilità d'uso LAMP è emersa come una valida alternativa alla PCR, in particolare in contesti con risorse limitate. Attualmente vari gruppi di ricerca sono impegnati nello sviluppo di sistemi multiplex volti alla rilevazione simultanea di geni di virulenza e di resistenza agli antibiotici.

*Rotavirus, adenovirus, norovirus, astrovirus e sapovirus*, vari studi suggeriscono che test molecolari per questi patogeni enterici virali debbano essere inclusi negli algoritmi diagnostici iniziali, per l'elevata sensibilità, specificità, rapidità di esecuzione, con la possibilità, ove la tecnologia lo consenta, di stabilire la concentrazione del target, fattore prezioso per valutare il significato clinico dei patogeni enterici virali rilevati.

Per le gastroenteriti, così come per altre patologie infettive, data l'eterogeneità della componente eziologica, sono stati sviluppati e descritti in letteratura sistemi molecolari multiplex volti all'individuazione di patogeni enterici batterici, virali e parassitari. Tra questi sistemi, si riconoscono i pannelli sindromici (PS), in grado di determinare, in tempi rapidi, da campione primario, la presenza di molteplici target rappresentativi dei patogeni prevalenti per determinate sindromi cliniche. L'approccio "sindromico", consente di valutare l'insieme dei potenziali microrganismi patogeni partendo da un sospetto diagnostico clinico di probabile o possibile natura infettiva. Negli ultimi anni sistemi molecolari multiplex hanno trovato sempre più spazio, nell'arena diagnostica gastroenterologica e la letteratura scientifica internazionale è andata via via arricchendosi di numerose esperienze in merito. L'uso di questi sistemi in affiancamento o in sostituzione dei sistemi convenzionali rimane tuttavia controverso: se da un lato il dosaggio molecolare può garantire un incremento della sensibilità rispetto ai metodi tradizionali, vi sono perplessità sulla specificità dei pannelli multiplex e sull'interpretazione dei risultati positivi, specialmente quelli a positività multipla.

In merito ai pannelli molecolari multiplex, da una revisione critica delle numerose esperienze prodotte negli ultimi decenni si possono evincere alcuni concetti

- Mediante tecniche di diagnostica tradizionale l'identificazione di agenti patogeni gastroenterici si verifica solo nel 25-58% dei casi. Questo può essere il risultato di una mancata verifica di particolari agenti patogeni, di scarsa sensibilità dei sistemi di indagine utilizzati, di presenza di agenti infettivi ancora ignoti o di cause non infettive. Fino ad un recente passato, inoltre, le stime sulle cause infettive della diarrea sono derivate da studi basati su approcci diagnostici diversificati (colture, tecniche di concentrazione delle feci, microscopia, rilevamento di antigeni, PCR), ciascuno con la propria sensibilità, in grado di influenzare in maniera sostanziale le stime del peso. La definizione infine di algoritmi diagnostici per ogni possibile agente patogeno può essere un compito non semplice, necessitando di una vasta gamma di tecniche di laboratorio e di conoscenze ed esperienze adeguate.
- Per la maggior parte dei patogeni, batterici, virali o parassitari, l'incidenza attribuibile derivata da indagini molecolari supera la stima derivata dalla diagnostica tradizionale (aumento della prevalenza complessiva dei patogeni enterici). Vari studi hanno indicato che l'introduzione di nuove tecnologie, riducendo drasticamente il TAT di test diagnostici, favorisca una migliore gestione del paziente, consentendo una riduzione del soggiorno ospedaliero e dei costi.

- Gli strumenti molecolari multiplex, migliorando la rilevazione di infezioni enteriche singole e multiple rispetto alle tecniche classiche, potrebbero diventare l'elemento chiave nella gestione di diarrea acuta grave in particolari tipologie di pazienti, quali i destinatari del trapianto.
- L'implementazione con pannelli multiplex estesi in un laboratorio di salute pubblica potrebbe facilitare l'attività di screening dei principali agenti patogeni gastroenterici, fornendo un valido strumento per migliorare le risposte di un laboratorio di sanità pubblica durante focolai epidemici
- Un sistema molecolare multiplex può costituire uno strumento di screening primario, ma i risultati positivi andrebbero comunque verificati, dove possibile, dall'isolamento in coltura come test reflex e di approfondimento (antibiogrammi) o confermati con metodi indipendenti per discriminare l'infezione attiva dalla dispersione asintomatica degli acidi nucleici fecali.

- Ci sono due categorie principali di test molecolari multiplex. Una categoria conosciuta come pannello sindromico multiplex in grado di rilevare varie classi di agenti causali, quali batteri, virus e parassiti, responsabili di un particolare quadro clinico-sintomatologico, su un'unica piattaforma. L'altra categoria comprende saggi molecolari multiplex orientati verso una sola e circoscritta classe di agenti patogeni. Questi test commerciali differiscono in molti aspetti, tra cui il numero di agenti patogeni che il saggio rileva, il tempo complessivo per i risultati e la complessità del saggio.
- I vantaggi di testare un campione per più patogeni utilizzando un singolo test sono sintetizzabili: a) nel beneficio legato all'alta sensibilità e specificità offerte dalla maggior parte dei test molecolari; b) nella riduzione dei tempi di analisi e di ottenimento dei risultati (TAT); c) nell'aiuto ai fornitori di assistenza sanitaria volto a migliorare la gestione dei pazienti; d) nell'identificare una vasta gamma di potenziali patogeni e possibili co-infezioni.
- Test molecolari multiplex hanno valore clinico: prevedono un approccio sintomatico alla diagnostica, che è particolarmente utile per le infezioni in cui non è possibile determinare l'agente eziologico basandosi quasi esclusivamente sui sintomi.
- La decisione su quale piattaforma commerciale scegliere può dipendere da una serie di fattori, tra cui (i) le prestazioni dei test, (ii) il costo, (iii) il flusso di lavoro, (iv) il volume di produzione, e (v) la popolazione di pazienti da testare. In merito ai costi andrebbe considerato anche l'impegno economico per il sistema sanitario legato alla tempestività delle prestazioni diagnostiche, non solo il costo del test al laboratorio, in considerazione delle conseguenze di diagnosi tardive. I fattori da considerare comprendono diminuzione uso di antibiotici, diminuzione test accessori, diminuzione della durata di degenza ospedaliera e dal lavoro.
- La capacità di rilevare un gran numero di agenti patogeni rapidamente e con alta sensibilità e specificità ha il potenziale per trasformare la microbiologia clinica. Per i Laboratori che si occupano di microbiologia clinica è importante stabilire se attuare strategie restrittive nell'uso di questi test, riservandone l'impiego a particolari categorie di pazienti (ad esempio, pazienti immunocompromessi) o a particolari condizioni ad elevata criticità, o se utilizzarli senza particolari limitazioni in quanto ritenuti appropriati quali test diagnostici di prima linea.
- Comprensione delle caratteristiche prestazionali di tutti i membri del pannello è essenziale, poiché la sensibilità e la specificità per il rilevamento di ciascun patogeno può

variare. La prevalenza del patogeno influisce notevolmente sul valore predittivo positivo e/o negativo del test.

- La richiesta di test diagnostici per alcuni patogeni dovrebbe essere guidata da fattori di rischio per l'infezione. L'infezione da C. difficile è associata a specifici fattori di rischio, tra cui l'esposizione ad agenti antimicrobici, il più importante, il ricovero ospedaliero, l'età, ma anche la chemioterapia, la chirurgia gastrointestinale. Inoltre, la colonizzazione da C. difficile (compresi C. difficile con i geni della tossina) si verifica in alcuni gruppi di popolazione, come i bambini, in particolare quelli con malattia infiammatoria intestinale. L'interpretazione di un risultato positivo per C. difficile in un paziente senza fattori di rischio per questa infezione può risultare quindi problematica.

- I pannelli commerciali sindromici, comunemente disponibili, sono generalmente qualitativi, non distinguendo tra rilevamento di enteropatogeni di basso livello di rilevanza ed infezioni clinicamente più rilevanti.
- Il trasporto asintomatico di alcuni enteropatogeni può risultare comune in differenti aree geografiche e in differenti tipologie di soggetti (bambini vs adulti vs anziani) (immunodepressi vs immunocompetenti). Si ritiene che la quantità di acido nucleico distingua la malattia clinica dalla diffusione asintomatica.
- Un dosaggio con PCR quantitativa potrebbe contribuire ad una migliore e più corretta interpretazione del risultato tenendo conto che le cariche microbiche associate alla diarrea variano notevolmente in base al patogeno.
- *In alcune indagini la positività molecolare per determinati patogeni (Shigella*, EIEC, adenovirus, rotavirus, ST-ETEC) *risulta più facilmente correlabile alla sintomatologia e alla quantificazione in termini di Ct.*

Ente del Terzo Settore

- I test molecolari multiplex hanno le potenzialità per semplificare e accelerare gli algoritmi diagnostici rispetto ai metodi convenzionali. Tuttavia l'impatto di questi test sulla gestione dei pazienti, il trattamento e gli esiti non sono ancora totalmente compresi e sono necessari ulteriori studi per valutare l'impatto economico sulla salute rispetto ai metodi convenzionali. Vi è infatti ancora una notevole incertezza sul rapporto costo-efficacia dei pannelli multiplex utilizzati per testare la sospetta gastroenterite infettiva in ambito ospedaliero e comunitario. Le incertezze nel modello includono la durata della degenza, ipotesi sui risultati falsi positivi e i costi dei test.
- Nessuno studio finora prodotto ha fornito uno standard di riferimento adeguato con cui confrontare l'accuratezza del test multiplex rispetto ai test convenzionali. I test multiplex generalmente identificano correttamente gli agenti patogeni identificati dai test convenzionali. Questi test tuttavia generano anche notevoli ulteriori risultati positivi di incerto significato: non è chiaro se questi "positivi" aggiuntivi siano sempre e comunque clinicamente importanti. A questo proposito, una migliore comprensione della patogenicità, della gravità della malattia e della risposta dell'ospite saranno necessarie per interpretare accuratamente le implicazioni di modelli di coinfezione.

### 7.14 Indagini- biosensori

Secondo l'*International Union of Pure and Applied Chemistry*, un biosensore è un dispositivo trasduttore recettore integrato (proteina o DNA) in grado di fornire specifiche informazioni quantitative o qualitative tramite un elemento di riconoscimento biologico (BRE). Gli elementi di riconoscimento biologico utilizzati nel rilevamento microbico includono anticorpi, tossine, acidi nucleici, cellule intere e materiali biomimetici. La tecnologia dei biosensori comprende un approccio microbiologico applicato alla rilevazione batterica che definisce una molecola o un gruppo di molecole incorporando materiali immobilizzati sulla superficie di un trasduttore fisico-chimico o di un microsistema trasduttore. Un segnale di riconoscimento viene generato quando uno specifico analita si lega all'elemento di riconoscimento biologico. Il segnale può essere rappresentato da variazioni di massa, consumo di ossigeno, differenza di potenziale, indice di rifrazione, pH, corrente e altri parametri. Si prevede che una tecnica di biosensori possa sostituire i test immunologici e basati sugli acidi nucleici esistenti.

## 8. ALGORITMI DIAGNOSTICI

L'approccio tradizionale all'indagine microbiologia di campioni di feci per la ricerca di *Salmonella/Shigella* è volto a minimizzare i costi relativi alla discriminazione di *Salmonella* e *Shigella* dalla pletora di *Enterobacteriaceae* non patogene presenti nei campioni fecali. Tipicamente questo approccio prevede la selezione di colonie lattosio-non fermentanti e/o H2S produttrici su un terreno primario, per successivi screening secondari. Questo secondo screening può non essere necessario se il laboratorio utilizza un terreno cromogenico nel *setup* primario. Alla selezione di colonie sospette fa seguito una conferma identificativa a livello di genere/specie su base biochimica o spettrometrica. Ulteriori approfondimenti relativi ai sierotipi coinvolti sono riservate ai Centri di Riferimento Regionali e Nazionali.

In merito alla ricerca di *Campylobacter*, accanto ad un algoritmo tradizionale colturale (microaerofilia, termofilia, terreni selettivi) e identificativo, può essere previsto l'inserimento di saggi immunologici (EIA, IC) quale integrazione alle indagini tradizionali. (vedi ***flow charts***).

In merito a *Clostridium difficile* 3 sono i metodi comunemente utilizzati per rilevare la presenza degli stipiti tossinogenici nelle feci: dosaggio immunoenzimatico di glutammato-deidrogenasi (GDH), dosaggio immunoenzimatico delle tossine A/B, test di amplificazione molecolare dei geni delle tossine A/B (NAATs). Il test immunoenzimatico GDH, molto sensibile ma aspecifico, non distinguendo stipiti non tossinogenici da quelli tossinogenici, richiede ulteriori conferme con altri sistemi. Vi sono vari sistemi per confermare la tossinogenicità di stipiti GDH-positivi: test di neutralizzazione di citotossicità in colture cellulari (CCCN) o rilevamento della presenta di tossine A/B mediante sistema immunoenzimatico (A/B EIA) o molecolare (NAAT). I test commerciali volti alla ricerca di tossine A/B con sistema EIA soffrono di una limitata sensibilità nel confronto con la coltura tossinogenica. Per questa ragione la conferma della tossigenicità solo con sistema EIA non è considerato sufficiente per escludere una CDI. La determinazione di geni tossinici mediante NAAT offre una sensibilità decisamente maggiore ma a costi più elevati. Va anche precisato che il riscontro di geni per le tossine A/B con test EIA o CCCN negativi va interpretato in quanto l'espressione di geni non si accompagna necessariamente alla produzione di tossine e la presenza di uno stipite

tossinogenico potrebbe rappresentare una colonizzazione, piuttosto che un'infezione. Sono stati proposti differenti algoritmi, a due o 3 *steps* (vedi ***flow charts***).

Lo sviluppo di sistemi molecolari multiplex volti all'individuazione di patogeni enterici batterici, virali e parassitari ha portato alla definizione di algoritmi diagnostici che utilizzino i saggi molecolari come screening iniziale, seguito da eventuali approfondimenti colturali dove necessario (antibiogrammi, tipizzazioni). (vedi ***flow charts***).

## 9. RESISTENZE BATTERICHE

Generalmente gli antimicrobici non sono indicati per il trattamento di pazienti affetti da gastroenterite batterica in quanto solitamente a risoluzione spontanea. In alcuni casi può essere controindicato il trattamento in relazione all'ospite, come nel caso di infezione di STEC, che pone il paziente a maggior rischio di HUS, o per *Salmonella* con il rischio di ricadute e di persistenza come portatori. I test di sensibilità non sarebbero quindi indicati per batteri isolati da feci, salvo alcune eccezioni come bambini sotto i sei mesi, i pazienti anziani o immunocompromessi o pazienti con malattie croniche. In qualsiasi caso l'isolamento di *Salmonella* Typhi o *S.* Paratyphi così come l'isolamento di altri patogeni enterici da siti extraintestinali dovrebbe implicare i saggi di sensibilità.

Gli standard interpretativi per i test di sensibilità relativi ad *Enterobacteriaceae* (*Escherichia, Salmonella, Shigella* e *Yersinia*), così come per *Aeromonas, Campylobacter* e *Vibrio*, sono forniti da CLSI ed EUCAST. Negli USA il CDC monitorizza le resistenze antimicrobiche per germi enteropatogeni, mentre a livello europeo i dati sono forniti da EARSS. I farmaci di prima scelta nel trattamento di infezioni da *Campylobacter* includono ciprofloxacina ed eritromicina.

Nel 2018-2019, i dati sulla resistenza antimicrobica nei batteri zoonotici e indicatori, presentati da 28 Stati membri dell'UE, sono stati analizzati congiuntamente dall'EFSA (*European Food Safety Authority*) e dall'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*).

Nel 2019, elevate percentuali di isolati di Salmonella di isolamento umano erano resistenti ai sulfamidici (29,0%), all'ampicillina (25,8%) e alle tetracicline (25,6%). Per le serovarianti, la resistenza a questi composti variava da bassa (4,3–8,0%) in S. Enteritidis a livelli estremamente elevati (70,3–87,1%) in S. Typhimurium monofasica e S. Kentucky. La variazione nella proporzione di resistenza per Paese era ampia. Ad eccezione di S. Kentucky, la resistenza alla gentamicina è stata complessivamente bassa (2,3%), così come per trimetoprim (7,0%), con l'eccezione di S. Kentucky, S. Typhimurium e S. Infantis (14,6–18,6%).

La percentuale di isolati di Salmonella resistenti a ciprofloxacina è stata complessivamente del 13,5%. In S. Enteritidis e S. Infantis, questa percentuale variava in modo significativo tra i vari Paesi (0,0% - 51,1%). Per le cefalosporine di terza generazione (cefotaxime e ceftazidime), i livelli di resistenza erano generalmente bassi tra *Salmonella* spp. (rispettivamente 1,8% e 1,2%), con livelli più elevati (4,7–6,9%) rilevati tra isolati di *S.* Infantis e *S.* Kentucky. per quanto riguarda *S.* Infantis, valori anomali per entrambe le cefalosporine sono stati osservati in Italia e nel Regno Unito (23,5–31,6%).

La resistenza combinata a ciprofloxacina e cefotaxime era complessivamente bassa in Salmonella spp. (0,5%), ma significativamente più alta in S. Infantis (2,1%) e S. Kentucky (7,0%) con percentuali particolarmente elevate di resistenza combinata osservate tra S. Infantis isolati dall'Italia (26,3%) e tra isolati *di* S. Kentucky dai Paesi Bassi (20,0%).

Nel 2019 è stato identificato un solo *isolato di* Salmonella produttore di cabapenemasi da casi umani (*S.* Thiphimurium var. 05), rispetto ai cinque nel 2018.

L'incidenza di MDR tra gli isolati di Salmonella spp. da casi umani nell'UE è stata complessivamente elevata (25,4%) Per i sierotipi studiati, MDR è stato riportato più frequentemente tra S. Typhimurium monofasico (73,8%) e S. Kentucky (73,7%), seguiti da S. Infantis (35,7%), S. Typhimurium (30,9%), S. Derby (11,8%) e infine S. Enteritidis (3,2%).

Anche il CDC segnala un incremento di infezioni da *Salmonella* non tifoidee resistenti alla ciprofloxacina, riportando, nel 2017, valori attorno al 10%. Viene segnalato inoltre che la percentuale di infezioni da *Salmonella* Typhi non suscettibili alla ciprofloxacina ha raggiunto il 74%, limitando fortemente, in questi casi, le opzioni terapeutiche. La resistenza nei confronti di ceftriaxone e azitromicina rimane bassa (3% e 1%, rispettivamente).

Sempre a livello di UE, nel 2019 sono stati segnalati livelli di resistenza alla ciprofloxacina molto alti negli isolati umani di Campylobacter provenienti dalla maggior parte dei Paesi europei: la resistenza riscontrata è stata rispettivamente del 61,5% e del 61,2% per C. jejuni e C. coli. L'incidenza di isolati umani di C. jejuni resistenti all'eritromicina era complessivamente bassa, pari all'1,5%, ma notevolmente più elevata in C. coli (12,9%), con percentuali ancora più elevate (22,7-27,3%) in alcuni Stati membri e un tasso estremamente elevato (73,1%) in uno Stato membro (Portogallo).

I livelli di resistenza alla tetraciclina sono risultati alti (47,2%) e molto alti (66,9%) in C. jejuni e C. coli, rispettivamente, mentre sono stati riportati bassi livelli di resistenza alla gentamicina ad eccezione dell'Italia per C. coli (18,8%).

Nel 2019 la resistenza combinata sia alla ciprofloxacina che all'eritromicina, considerate di fondamentale importanza per il trattamento della campilobatteriosi, è stata generalmente bassa (1,0%) in C. jejuni e moderata (10,4%) in C. coli.

La multiresistenza ai farmaci (MDR) negli isolati testati per quattro classi antimicrobiche (fluorochinoloni, macrolidi, tetracicline e aminoglicosidi) era complessivamente bassa in C. jejuni ma moderata in C. coli.

Nel medesimo periodo, in America (CDC) viene riportato un incremento di resistenza ai fluorochinolonici (28%), sia tra gli isolati umani che animali per *C.jejunii* e *C.coli*. Questo incremento di resistenza può essere correlato all'uso veterinario di fluorochinoloni nell'alimentazione animale. In contrasto la resistenza ai macrolidi, seppure in crescita, rimane bassa (4%). La resistenza combinata a ciprofloxacina ed eritromicina, risulta generalmente bassa (2,0%).

# 10. BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE


- Baker-Austin C., et al.,"Vibrio spp. infections", Nat Rev Dis Primers, 2018
- Bányai K., "Viral gastroenteritis" Lancet, 2018
- Braz V.S., Melchior K., Moreira C.G., *"Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium", Front Cell Infect Microbiol, 2020
- Chen K., et al., "Diagnostic Accuracy of Nucleic Acid Amplification-Based Assays for Clostridium perfringens-Associated Diseases: a Systematic Review and Meta-analysis", J Clin Microb, 2020
- Cortés-Sánchez De Jesùs A., et al., "*Plesiomonas*: A Review on Food Safety, Fish-Borne Diseases, and Tilapia" Scientific World Journal, 2021
- Costa D., Iraola G., "Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species", Clin Microb Rev, 2019
- Croxen M.A., et al., "Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli" Clin Microb Rev, 2013
- de Boer R., et al., "Assessing the Public Health Risk of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by Use of a Rapid Diagnostic Screening Algorithm", J Clin Microb, 2015
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, "The European Union One Health 2019 Zoonoses Report" EFSA Journal, 2021
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019", EFSA J., 2021
- Fernandez-Bravo A., Figueras M.J., "An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity", Microorganism, 2020
- Fiztgerald C. et al., et al., "Multicenter evaluation of clinical diagnostic methods for detection and isolation of *Campylobacter* spp. from stool" J Clin Microb, 2016
- Fleckenstein J.M., Kuhlmann M., "Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections", Curr Infect Dis Rep., 2020
- Fleckenstein J.M., Kuhlmann M., Sheikh A., "Acute Bacterial Gastroenteritis" Gastroenterol Clin North Am, 2021
- Gerace E. et al., "Recent Advances in the Use of Molecular Methods for the Diagnosis of Bacterial Infections" Pathogens, 2022
- Guerrant L.R. et al. "Practice Guidelines for the management of infectious diarrea" CID, 2003
- Humphries R.M., Linscott A.J., "Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis" Clin Microbiol Rev, 2015
- Igwaran A., Okoh A.I., "Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance", Heliyon, 2019
- Janda J.M., Abbott S.L., McIver C.J., "*Plesiomonas shigelloides* Revisited" Clin Microb Rev, 2016
- Marcon M.J., Kiska D.L., Riddel S.W., "Should All Stools Be Screened for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*?" J Clin Microb, 2011
- Lee K-M., et al., "Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety" Food Control 2015

- Pakbin B., Brück W.M., Rossen W.A. "Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review", Int J Mol Sci, 2021
- Platts-Mills J.A., et al., "Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study" Lancet Glob Health, 2018
- Popa G.L., Popa M.I., "*Salmonella* spp. infection - a continuous threat worldwide" Germs, 2021
- Ramamurthy T., "Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139", Vaccine, 2020
- Ramarao N., et al., "Advanced Methods for Detection of *Bacillus cereus* and Its Pathogenic Factors", Sensor(Basel), 2020
- Riahi S.M., Ahmadi E., Zeinali T., "Global Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Cases of Gastroenteritis: A Systematic Review and Meta-Analysis" Int J Microbiol, 2021
- Schreckenberger P.C., McAdam A.J., "Point-Counterpoint: Large Multiplex PCR Panels Should Be First-Line Tests for Detection of Respiratory and Intestinal Pathogens", J Clin Microb, 2015
- Shane A.L., et al., "2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea" CID, 2017
- Schnupf P., Sansonetti P.J., "*Shigella* Pathogenesis: New Insights through Advanced Methodologies" Microbiol Spectr, 2019
- Schuetz A.N., "Emerging agents of gastroenteritis: Aeromonas, Plesiomonas, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*", Semin Diagn Pathol, 2019
- Shea S., et al., "Clinical Microbiology Laboratories' Adoption of Culture-Independent Diagnostic Tests Is a Threat to Foodborne Disease Surveillance in the United States" J Clin Microb, 2017
- Shoaib M., et al. "A comprehensive review on the prevalence, pathogenesis and detection of *Yersinia enterocolitica*", RSC Adv, 2019
- Steyer A., et al., "Narrowing of the Diagnostic Gap of Acute Gastroenteritis in Children 0-6 Years of Age Using a Combination of Classical and Molecular Techniques, Delivers Challenges in Syndromic Approach Diagnostics" Pediatr Jnfect Did J, 2016
- Wilber E., Baker J.M., Rebolledo P.A., "Clinical Implications of Multiplex Pathogen Panels for the Diagnosis of Acute Viral Gastroenteritis" J Clin Microb, 2021

# EZIOLOGIA – SCHEDE TECNICHE

# BATTERI ASSOCIATI AD INFEZIONI INTESTINALI

## *Escherichia coli*

*Escherichia coli* fa parte della normale flora fecale dell'uomo e, tuttavia, attraverso guadagno e perdita di componenti genetiche, può diventare un agente patogeno altamente diversificato e adattato. Sulla base delle caratteristiche patogenetiche e delle espressioni fenotipiche, i patotipi umani di *E. coli* diarroico (DEC) sono differenziati da *E. coli* non patogeno e da *E. coli* patogeno extraintestinale (ExPEC). Le varianti patogene di *E. coli* (patovarianti o patotipi) causano morbilità e mortalità in tutto il mondo. Mentre diversi patotipi contribuiscono alla diarrea, il meccanismo di colonizzazione, il sito bersaglio, i sintomi, il decorso clinico e le complicanze possono differire, in modo significativo. La classificazione patogenomica e fenotipica del gruppo DEC è stata più volte rivisitata e aggiornata e attualmente si possono riconoscere nove patotipi distinti, in relazione alle caratteristiche differenziali e ai geni di virulenza essenziali che definiscono ciascun sottogruppo: *E. coli* produttore di tossina *Shiga* (STEC), *E. coli* enteroemorragico o verocitotossico (EHEC, VTEC), ritenuto da più parti un sottogruppo di STEC, *E.coli* enteropatogeno (EPEC), *E.coli* enterotossigenico (ETEC), *E.coli* enteroinvasivo (EIEC), *E.coli* enteroaggregante (EAEC), *E. coli* diffusamente aderente (DAEC), *E. coli* invasivo aderente (AIEC) ed *E. coli* distaccante cellulare (CDEC).

A causa della plasticità del genoma di *E. coli*, la definizione dei patotipi è in costante aggiornamento e, sebbene ancora di uso corrente, la classificazione in patotipi può ritenersi superata. Gli elementi genetici mobili sono infatti responsabili della comparsa di nuovi ceppi di *E. coli* patogeni ibridi (HyPEC), con un distinto assortimento di tratti di virulenza e resistenza antimicrobica. Questi cosiddetti *cross-pathotype* di *E.coli* sono in grado di unire caratteristiche di virulenza ibride tra i diversi patotipi e, negli ultimi anni, grazie alla genomica, sono stati ampiamente documentati (es. *E.coli* O104 in Germania).

## *ETEC*

*Escherichia coli* appartenenti al patotipo ETEC rappresentano il patogeno più comune identificato nella diarrea del viaggiatore (20-40%) e risultano endemici nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo. *E coli* del gruppo ETEC risultano essere una delle principali minacce per la salute globale, in particolare tra i bambini piccoli nelle aree del mondo con risorse limitate. Si stima che i bambini di età inferiore ai cinque anni soffrano di oltre un miliardo di casi di malattie diarroiche all'anno, con la sola ETEC collegata a centinaia di milioni di episodi di diarrea. Le stime regionali di morte e morbilità associate all'ETEC e ad altri patogeni enterici variano ampiamente nelle più recenti valutazioni epidemiologiche. È interessante notare che, con l'avvento dei test molecolari, il carico di malattia specifico del patogeno ETEC è aumento di circa 1,5 volte e sono sempre più identificati sia casi sporadici che epidemie diarroiche legate a questi patotipi. Le epidemie nei paesi sviluppati sono sporadiche anche se questi focolai sono probabilmente sottovalutati, poiché l'ETEC è raramente ricercato nei casi di diarrea. Sebbene l'ETEC sia endemico nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo, si sono verificati focolai epidemici durante le principali inondazioni in Bangladesh. Negli ospedali sono stati segnalati focolai in unità di terapia intensiva neonatale, probabilmente a causa del latte contaminato. I ceppi ETEC hanno come serbatoio l'uomo e come modalità di trasmissione la via oro-fecale; si localizzano a livello del tenue, dove sono responsabili di quadri di

diarrea acquosa (colera-simile) con conseguente deplezione idrosalina e spesso spiccato stato di disidratazione, a cui possono accompagnarsi crampi, nausea e febbre. L'esposizione all'ETEC è di solito legata a cibo e acqua contaminati.

ETEC si differenziano per specifici fattori di virulenza quali fattori di colonizzazione ed enterotossine. I fattori di colonizzazione (CF o CFA: *colonization factor antigens*), permettono di colonizzare l'epitelio del piccolo intestino aderendo agli enterociti, facilitando la colonizzazione intestinale. Attualmente, sono stati caratterizzati almeno 22 CF. Queste strutture superficiali sono fimbriali, afimbriali, elicoidali o fibrillari e sono codificate principalmente su plasmidi. Le CF si legano a diversi recettori sulle cellule ospiti.

ETEC aderente elabora quindi le enterotossine che causano le manifestazioni cliniche tipiche della diarrea indotta da ETEC. A differenza della maggior parte degli altri patotipi, quasi tutti i fattori di virulenza noti sono codificati esclusivamente su plasmidi.

Per quanto riguarda le enterotossine, di esse sono stati distinte un tipo termolabile e due tipi termostabili, STa e STb (metanolo solubile e metanolo insolubile). Queste tossine possono essere trovate in forma isolata (solo ST) o in combinazione con LT (LT/ST). Complessivamente, la ST si trova in circa il 75-80% degli isolati ETEC e si riscontra più frequentemente nelle malattie umane gravi rispetto agli isolati solo LT. LT e CT appartengono a una vasta famiglia di tossine batteriche ADP-ribosilanti che stimolano l'attività adenilato ciclasica e guanilato ciclasica delle cellule intestinali con conseguente aumento intracellulare di AMP ciclico. La conseguente attivazione di protein-kinasi AMPc dipendente porta alla fosforilazione dei trasportatori apicali di membrana con secrezione di anioni ($Cl^-$ e $HCO_3^-$) da parte di cellule secretorie criptiche e inibizione dell'assorbimento di NaCl (ioni $Na^+$ e Cl) da parte delle cellule dei villi. L'aumento di ioni nel lume intestinale attira acqua. Quando questa azione supera la capacità di assorbimento intestinale si manifesta diarrea acquosa. Le enterotossine non provocano lesioni degenerative ma sono "citotoniche", in quanto esaltano funzioni enzimatiche delle cellule intestinali.

## EPEC

*Escherichia coli* appartenenti al patotipo EPEC, caratterizzati per la prima volta nel Regno Unito nel 1945, sono responsabili di focolai epidemici di diarrea infantile in reparti pediatrici o di epidemie di diarrea infantile; se il loro tasso risulta diminuito negli ultimi decenni nei paesi sviluppati, rimane, tuttavia, una delle maggiori preoccupazioni di salute pubblica per neonati e adulti nei paesi in via di sviluppo. Il serbatoio è rappresentato dall'uomo e la trasmissione avviene per via oro-fecale. La patogenicità di questi stipiti sarebbe legata all'effetto "attacco e cancellazione" (*attaching-effacing*) dell'epitelio intestinale, dovuta ad adesione iniziale alla mucosa intestinale del tenue, mediata dai pili formanti fasci (BFP), contatto stretto con enterociti, cancellazione dei microvilli, formazione di una struttura simil-piedistallo nella zona sottostante, internalizzazione che porta ad alterazione delle capacità digestive con accumulo di disaccaridi nel lume intestinale e conseguente diarrea osmotica. I geni responsabili delle lesioni A/E sarebbero localizzati a livello di un'isola di patogenicità cromosomica definita locus di cancellazione enterocitica (LEE) che codifica per un sistema di secrezione di tipo III (T3SS), la cui funzione principale è di secernere componenti proteiche di traslocazione ed effettrici direttamente nelle cellule ospiti. In seguito alla trasduzione di questi segnali all'interno della cellula ospite si manifestano una serie di eventi (attivazione di fosfolipasi, protein-kinasi, flusso di inositol-trifosfato e $Ca^{2+}$) che, provocando la

formazione di un ambiente iperosmolare nel lume dell'intestino, portano ad un conseguente richiamo d'acqua e, infine, alla diarrea.

## EIEC

*Escherichia coli* appartenenti al patotipo EIEC sono frequentemente associati ad episodi di diarrea causati da acque o cibi contaminati e sono responsabili di quadri di dissenteria simile a quella causata da *Shigella*, con presenza di PMN nelle feci, muco e sangue. EIEC differisce da altri patotipi di E. coli perché è un patogeno intracellulare obbligato senza fattori di aderenza o flagelli. Studi molecolari, in particolare analisi multilocus e genomiche hanno rivelato che EIEC e *Shigella* formano un singolo patotipo all'interno di *E. coli.* Attualmente non esiste una nomenclatura comune per *Shigella* ed EIEC che incorpori anche la relazione filogenetica tra diversi lignaggi.

I ceppi EIEC hanno come unico serbatoio l'uomo e una trasmissione oro-fecale, principalmente attraverso acqua e cibo contaminati o diffusione diretta da persona a persona. Spesso associati ad episodi di diarrea causati da acque o cibi contaminati sono responsabili di quadri di dissenteria simile a quella causata da *Shigella*.

L'EIEC è generalmente sottorappresentato nelle indagini epidemiologiche a causa delle sue manifestazioni cliniche meno gravi e per la somiglianza biochimica, genetica con *Shigella* da cui un'erronea classificazione. Nei programmi di sorveglianza governativa relativi alla salute condotti negli Stati Uniti, in Canada, Europa o Australia raramente sono stati segnalati focolai legati a EIEC.

EIEC e *Shigella* sono patogeni altamente invasivi che utilizzano, come nicchia replicativa, l'ambiente intracellulare delle cellule epiteliali intestinali (IEC) nell'intestino crasso.

EIEC penetrano nell'epitelio intestinale attraverso le cellule M**,** sottopopolazione di cellule del tessuto linfoide presenti tra le cellule mucosali dell'intestino, per raggiungere la sottomucosa sottostante mediante un meccanismo di transcitosi. EIEC vengono fagocitati dai macrofagi sottomucosi dove inducono morte cellulare cui fa seguito l'invasione basolaterale dei colonociti e la diffusione laterale.

L'invasione di cellule epideliali basolaterali, la sopravvivenza intracellulare, la replicazione e la diffusione cellula-cellula sono disciplinate dalla capacità del suo repertorio di effettori di sovvertire vie di segnalazione delle cellule ospiti. La riuscita dell'infezione dipende da determinanti di virulenza codificati da loci cromosomici e plasmidici che includono componenti del complesso T3SS, chaperon, regolatori trascrizionali, traslocatori e circa 25 proteine effettrici. La vasta gamma di strumenti di virulenza di EIEC derivava principalmente dall'acquisizione del plasmide invasivo pINV. Gli effettori T3SS sono responsabili del movimento intra e intercellulare altrimenti non motorio di *Shigella*. La motilità acquisita aiuta anche il patogeno a diffondersi nelle cellule vicine.

Una volta localizzato nel citoplasma delle cellule epiteliali, l'EIEC sopprime la risposta immunitaria dell'ospite e contrasta il sistema di difesa immunitaria utilizzando effettori proteici per persistere e sopravvivere all'interno dei colonociti.

La presentazione clinica e la progressione variano a seconda dell'agente infettivo, del background immunologico dell'ospite. La diarrea ha in genere il carattere della dissenteria con presenza di PMN nelle feci, muco e sangue. Generalmente è presente affaticamento, malessere, febbre accompagnati da crampi addominali e tenesmo. Nella maggior parte dei casi, la forma è auto-limitante.

## STEC-VTEC-EHEC

Il termine STEC/VTEC include tutti i ceppi che producono tossine *Shiga-like* o verocitotossine ($Stx_1$ e $Stx_2$) (tossine che presentano proprietà citotossiche nei confronti di cellule Vero e HeLa), responsabili di forme di diarrea di varia entità. ***E. coli*** enteroemorragico (EHEC) (la terminologia EHEC è ormai obsoleta) è da ritenersi un sottogruppo di STEC, originariamente descritto in relazione alla sua associazione con colite emorragica. Nella maggior parte del mondo, STEC O157:H7 è il sierotipo più comune che causa la malattia umana, ma è da tempo evidente che anche ceppi di STEC non-O157 diano un importante contributo a casi sporadici ed epidemie in Nord America, Australia ed Europa. Negli Stati Uniti, in particolare, sono stati individuati sei sierogruppi STEC (O26, O45, O103, O111, O121 e O145, noti come i "Big 6"), più comunemente associati a malattie gravi negli esseri umani, anche se la prevalenza di STEC non-O157 varia geograficamente. In Europa il sierogruppo STEC O26 è il più frequentemente associato ai casi gravi di infezione da STEC ed in particolare SEU.

STEC è una causa predominante di malattia diarroica a livello globale. Una metanalisi, dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, ha stimato un'incidenza globale di 2,8 milioni di casi all'anno e 3890 casi di sindrome emolitico-uremica (SEU) all'anno. In Eu/EEA il numero di casi confermati di STEC è aumentato significativamente nel periodo 2008-2012 (1,7 casi/100000 all'anno) e il picco più alto si è verificato nel 2011, in gran parte legato ad una epidemia di STEC O104:H4 in Germania legata al consumo di germogli crudi. Più dell'80% delle infezioni era di origine domestica mentre circa il 70% di quelle correlate a viaggi erano acquisite in Paesi non europei, in particolare Asia e Africa. I tassi di notifica più elevati sono stati osservati in Irlanda e Danimarca. Complessivamente, per l'anno 2021, il 97,4% dei 4.472 casi di STEC segnalati negli esseri in UE erano domestici e l'1,4% è stato acquisito attraverso viaggi nell'UE. Il numero di casi infetti attraverso viaggi al di fuori dell'UE è stato di 117, molto inferiore a quello riportato nel 2019, probabilmente a causa dell'interruzione dei viaggi durante il primo e secondo anno della pandemia. Egitto, Turchia e Kosovo sono stati segnalati più frequentemente come il probabile paese di infezione. Si è confermata la tendenza stagionale dei casi confermati di STEC durante i mesi estivi.

I ceppi STEC hanno come principale serbatoio il tratto gastro-intestinale di bovini che, contaminando alimenti ed acqua, trasmettono l'infezione all'uomo (zoonosi). Le infezioni da STEC si contraggono generalmente in seguito al consumo di alimenti o acque contaminate, ma la patologia può conseguire anche da un contatto diretto con animali infetti o colonizzati o con ambienti contaminati. Le epidemie sono associate al latte crudo e all'acqua, carne di manzo macinato ed hamburger non adeguatamente cotti, a formaggi a base di latte crudo, vegetali a foglia (spinaci baby e insalate) e ad una varietà di altri alimenti che negli anni più recenti si è diversificata (farine, impasti per torte, pizze congelate ecc.). Le epidemie sono di solito conseguenti all'ingestione di alimenti non completamente cotti. È stata descritta anche la trasmissione interumana, particolarmente importante negli asili nido e scuole dell'infanzia.

I microrganismi del gruppo STEC sono responsabili di forme diarroiche di varia entità, generalmente caratterizzate da diarrea ematica, dolore addominale, nausea e vomito.

I ceppi STEC hanno la capacità di stabilirsi sulla mucosa enterica del colon inducendo lesioni di attacco e cancellazione (AE). Queste alterazioni, indipendenti dagli effetti di Stxs, sono codificate dal *locus of enterocyte effacement* (LEE) nel cromosoma STEC. L'isola di patogenicità LEE è essenziale per la formazione delle lesioni "attacco e cancellazione" (A/E) nella mucosa intestinale. Queste lesioni sono caratterizzate dalla

perdita locale di microvilli e da un intimo attaccamento dei batteri agli enterociti, insieme alla formazione di strutture simili a piedistalli sulla membrana basale.

A livello del colon possono essere prodotte due tossine, Shiga tossina 1 (*Stx1*) e Shiga tossina 2 (*Stx2*). Le tossine Shiga (*Stx*) sono prodotte dai patogeni durante la colonizzazione e la replicazione e vengono liberate dallo spazio periplasmatico come proteine libere o racchiuse nelle vescicole della membrana esterna rilasciate dai batteri. Le tossine Shiga (*Stx*) esercitano principalmente un'attività ribotossica nelle cellule bersaglio eucariotiche dell'ospite: agiscono come potenti inibitori del meccanismo di sintesi proteica nelle cellule eucariotiche inattivando le subunità ribosomiali 60S. L'inibizione della sintesi proteica e il danno al DNA intranucleare culminano in eventi di morte cellulare, che coinvolgono principalmente l'apoptosi.

Sebbene alcuni sierotipi STEC, in particolare O157:H7, siano più frequentemente associati a forme gravi di malattia nell'uomo e possano provocare colite emorragica con possibile sindrome emolitico-uremica (SEU)(HUS), recenti valutazioni sulla patogenicità condotte sia dall'OMS/FAO che dall'EFSA superano il concetto del sierotipo quale indicatore di patogenicità per l'uomo, concentrandosi invece sull'assetto dei geni di virulenza ed in particolare di *stx1*, *stx2 (*e relativi sottotipi*)* ed *eae* quali principali determinanti di patogenicità. La sindrome emolitico-uremica, che generalmente si manifesta dopo 5-13 giorni dall'episodio diarroico, si caratterizza per la triade insufficienza renale, anemia emolitica microangiopatica e trombocitopenia. Le manifestazioni cliniche gravi sono principalmente il risultato dell'induzione locale di citochine pro-infiammatorie, leucociti e la generazione di metaboliti reattivi. La risposta pro-infiammatoria è in grado di provocare danni alle cellule endoteliali microvascolari nei reni, nel colon e nel sistema nervoso centrale. La SEU è generalmente associata a ceppi STEC portatori di geni stx2. L'incidenza di HUS nei casi confermati varia tra l'8 e il 12% e la mortalità si attesta tra il 3 e il 5%. Incidenze più elevate di infezione da STEC si manifestano in bambini di età inferiore ai 5 anni e nelle persone anziane. Da non sottovalutare inoltre il potenziale epidemico legato alle infezioni da STEC con focolai di infezione, talora anche molto vasti, sia in ambito familiare che nella comunità. Dati dell'EFSA indicano che in EU tra il 2017 e il 2021 sono stati riportati 205 focolai epidemici di STEC. Tali episodi possono essere causati dal consumo di alimenti ed acque contaminate ma anche attraverso la trasmissione persona-persona. In tal senso il verificarsi di un caso di SEU rappresenta un evento sentinella di una possibile più vasta circolazione di STEC in una comunità e come tale dovrebbe sempre portare ad allargare i test diagnostici per STEC ai contatti dei pazienti con SEU, specialmente nelle comunità scolastiche.

Oltre che in microbiologia clinica, ci sono importanti implicazioni di STEC in microbiologia veterinaria (animali come serbatoi), microbiologia ambientale (terra e acqua) e microbiologia alimentare (contaminazione, manipolazione e preparazione).

## EAEC – EaggEC

*Escherichia coli* appartenenti a questo patotipo sono responsabili di diarrea persistente in lattanti e bambini e tra gli agenti causali di diarrea del viaggiatore; sono stati così definiti per la presenza di fimbrie, che promuovono una aggregazione tra batteri prima di aderire a cellule della mucosa e ad eritrociti umani.

Dati epidemiologici di EAEC, per la mancanza di indagini globali di sorveglianza, sono storicamente limitati al Nord America, all'Europa e al Sud America. Focolai sono stati segnalati, in Giappone, in India e più di recente nel continente africano (Mali, Libia, Africa sub-sahariana e Nigeria). Da notare la segnalazione, sempre più frequente di ceppi ibridi,

tra cui il ceppo portatore di geni di virulenza di EAEC e STEC, responsabile del focolaio del 2011 in Germania che ha coinvolto migliaia di persone.

La prevalenza di EAEC nelle feci dei pazienti con diarrea del viaggiatore varia in base a regione e studio. Da alcune indagini, negli ultimi anni, EAEC risulterebbe l'agente patogeno più frequentemente rilevato in pazienti provenienti dall'Africa orientale, Asia meridionale, America Latina e Caraibi. Nei paesi ad alto reddito, l'EAEC viene principalmente associata a malattie di origine alimentare. Analisi di campioni di feci di pazienti di ritorno dall'Africa occidentale hanno mostrato che le co-infezioni si verificano in un'elevata percentuale dei casi di diarrea del viaggiatore, con EAEC ed EPEC tra i co-patogeni più frequentemente rilevati. Co-infezioni con EAEC possono risultare anche con agenti patogeni virali, come il norovirus, con difficoltà interpretative sulla responsabilità del quadro clinico.

La trasmissione della diarrea del viaggiatore si verifica principalmente attraverso acqua e cibo contaminati (insalate, dolci, salse). Anche i gestori di alimenti possono essere portatori di EAEC. Gli animali non sembrerebbero risultare un serbatoio importante di EAEC nella patogenicità umana. Tuttavia, poiché gli isolati EAEC sono molto eterogenei, non si possono escludere serbatoi di animali per lignaggi non ancora caratterizzati.

Per la patogenesi EAEC, nonostante l'eterogeneità tra i diversi ceppi EAEC, è emerso un modello generale in tre parti: aderenza alla mucosa intestinale, produzione di enterotossine e citotossine e infiammazione della mucosa. Anche il sito di infezione nel tratto gastrointestinale non è uniforme, potendo essere coinvolte la mucosa digiunale, ileale e del colon. Durante le prime fasi, l'aderenza alla mucosa intestinale è associata sia ad adesine fimbriali (AAF) che afimbriali. Le adesine fimbriali sono codificate su un plasmide di virulenza, che codifica anche, per un fattore di trascrizione (AggR) che regola la biogenesi AAF. AggR è coinvolto nella regolazione di molti dei geni di virulenza coinvolti sia nelle fasi di aggregazione che di produzione di tossine. L'adesione alla mucosa intestinale è seguita da un danneggiamento dell'epitelio che si manifesta in forma di esfoliazione delle cellule epiteliali. EAEC producono distinte tossine e gli effetti di queste tossine includono la vescicolazione dei microvilli, aperture delle cripte e aumento dell'estrusione di cellule epiteliali. Queste tossine putative includono, una tossina che altera il citoscheletro (Pet), un'enterotossina termostabile (EAST-1), ShET1, una tossina in grado di stimolare l'attività di AMP ciclico (cAMP) e una mucinasi (Pic). È noto che gli AAF mediano anche la formazione di biofilm nell'EAEC. Durante le fasi avanzate di infezione, l'adesione di EAEC alle cellule epiteliali intestinali stimola il rilascio di interleuchine che portano al reclutamento neutrofili e stimolano la diarrea infiammatoria.

*E.coli* enteroaggreganti provocano diarrea secretoria acquosa, spesso con muco, che può essere accompagnata da febbre, nausea, vomito, dolore addominale e occasionalmente feci sanguinolente. Sia nei paesi in via di sviluppo che in quelli sviluppati, la diarrea da EAEC colpisce sia gli adulti che i bambini. Microrganismi del gruppo AEAC possono anche provocare diarrea acuta e persistente nei pazienti con infezione da HIV e diarrea persistente nei bambini, da cui crescita stentata e possibili carenze intellettuali. Nelle infezioni da EAEC forte preoccupazione per la salute pubblica deriva dalla malnutrizione nei bambini nei paesi in via di sviluppo, poiché le infezioni persistenti portano a un'infiammazione cronica, che danneggia l'epitelio intestinale e riduce la sua capacità di assorbire i nutrienti.

## DAEC

Il patotipo di *E. coli* diffusamente aderente descrive i ceppi di *E. coli* diarreagenici che si attaccano alle cellule ma non rientrano in schemi di aderenza classici, come quelli localizzati o quelli legati all'effetto "attacco e cancellazione" (*attaching-effacing*) dell'epitelio intestinale. Il patotipo DAEC è stato definito dalla sua aderenza diffusa (DA) alle cellule epiteliali HEp-2 in coltura, in cui l'adesione batterica si verifica su tutta la superficie della cellula. DAEC sono attualmente considerati distinti da altri patotipi ma la loro epidemiologia risulta ancora poco chiara non essendo perfezionati i metodi di rilevamento per i ceppi diarreagenici e non esistendo attualmente un metodo universale di rilevamento in ambiente clinico.

Gli isolati DAEC sono stati identificati da bambini con diarrea in Cile, Messico, Australia, Regno Unito, Brasile, Perù, Colombia e molti altri paesi, compresi gli Stati Uniti, suggerendo, in alcuni casi (Brasile) un'elevata diffusione del patotipo. I meccanismi di trasmissione e i serbatoi non sono ancora noti.

Gli stipiti DAEC sono caratterizzati dalla produzione di adesine Afa/Dr, classe di adesine in grado di legarsi ad un fattore (DAF), una molecola che è altamente espressa sulla superficie apicale delle cellule epiteliali polarizzate. Dopo il legame e in seguito all'internalizzazione che favorisce la sopravvivenza di DAEC, viene indotto un riarrangiamento del citoscheletro con distruzione e/o riorganizzazione parziale dei microvilli. Anche il riarrangiamento delle proteine associate alle giunzioni strette porta ad una maggiore permeabilità paracellulare. Il legame con le cellule epiteliali porta all'attivazione di citochine proinfiammatoriee alla conseguente migrazione di PMN attraverso la barriera epiteliale.

DAEC è associato a diarrea acquosa che può diventare persistente nei bambini piccoli, con un aumento della gravità della malattia dall'età di 18 mesi a 5 anni. Si ritiene che gli adulti più anziani possano diventare portatori asintomatici ed è stato ipotizzato che il trasporto di DAEC possa portare a malattie infiammatorie croniche intestinali. La reidratazione è attualmente l'unico trattamento raccomandato per la diarrea acquosa causata dal DAEC.

## AIEC

*E. coli* aderente invasivo non esprime i comuni fattori di virulenza trovati in vari altri ceppi patogeni di E. coli e le basi genetiche del suo fenotipo proinfiammatorio e invasivo non sono completamente comprese. E. coli aderente invasivo (AIEC), filogeneticamente più strettamente correlato a E. coli patogeno extraintestinale (ExPEC), è stato implicato come uno tra gli agenti causali per la malattia di Crohn, malattia causata da una combinazione di fattori, tra cui la predisposizione genetica, la disbiosi microbica, fattori ambientali avversi e alcuni patogeni enterici. Sebbene i dati epidemiologici sull'AIEC in relazione al CD siano limitati, i dati disponibili suggeriscono una correlazione tra la presenza di CD e la presenza di AIEC, rendendo questo patotipo una minaccia per la salute e un obiettivo terapeutico rilevante. L'organizzazione del genoma AIEC è simile a quella di altri ceppi patogeni di E. coli, con ampie regioni del genoma centrale interrotte con isole genomiche. Queste isole genomiche portano i determinanti genetici che contribuiscono all'adesione batterica, all'invasione e alla sopravvivenza intracellulare e che spiegano il patotipo AIEC.

Il sequenziamento del genoma ha aiutato a identificare quattro potenziali determinanti della virulenza tra cui, un sistema di secrezione di tipo VI che si ritiene che supporti la sopravvivenza intracellulare, diversi geni che codificano per le adesine, in particolare di

tipo pilare, importanti per l'adesione all'epitelio intestinale e di tipo fimbriale cruciali nelle fasi invasive, vari regolatori trascrizionali dei geni di virulenza, e geni coinvolti nell'acquisizione del ferro, tratto essenziale di virulenza nei ceppi ExPEC. Oltre all'invasione delle cellule epiteliali intestinali, l'AIEC è anche in grado di traslocare attraverso l'epitelio per accedere al tessuto linfoide sottostante, esprimendo lunghe fimbrie polari che interagiscono con le cellule M, un monostrato di cellule epiteliali specializzate sulla superficie delle placche di Peyer, consentendo all'AIEC di accedere alla lamina propria. Una volta ottenuto l'accesso alla lamina propria, AIEC può infettare e replicarsi all'interno dei fagolisosomi dei macrofagi senza provocarne la morte. La replicazione nei macrofagi infetti provoca la secrezione di alti livelli di TNF-α, causando infiammazione intestinale e formazione di granuloma nei pazienti con CD.

L'AIEC sarebbe associato a lesioni sia precoci che croniche in CD, suggerendo un coinvolgimento nelle fasi iniziali della malattia così come nella sua cronicizzazione infiammatoria.

Trattamento: un CD mediato da AIEC potrebbe essere trattato utilizzando strategie coinvolte nella prevenzione della replicazione, adesione e invasione dell'AIEC. È stato documentato che i sintomi clinici della CD migliorano quando le concentrazioni di batteri luminali vengono ridotte tramite lavaggi intestinali o farmaci antibatterici, come gli antibiotici, il cui uso continuato deve essere considerato con cautela a causa degli effetti drastici sulla composizione microbica e sullo stato immunitario dell'intestino.

## *Salmonella*

Il genere *Salmonella* rappresenta il più comune patogeno di origine alimentare, responsabile di infezioni zoonotiche nell'uomo e in specie animali. Le infezioni da *Salmonella* rappresentano una delle principali preoccupazioni per la salute pubblica, gli animali e l'industria alimentare in tutto il mondo.

Il genere Salmonella**,** altamente diversificato, è diviso in due specie: Salmonella enterica e Salmonella bongori. Sulla base delle proprietà biochimiche e della parentela genomica, S. enterica è ulteriormente classificata in sei sottospecie. Queste sottospecie sono denominate da numeri romani: I. S. enterica subsp. enterica; II. S. enterica subsp. salamae; III. S. enterica subsp. arizonae; IIIa. S. enterica subsp. diarizonae; IV. S. enterica subsp. houtenae; e V. S. enterica subsp. indica. Di tutte le sottospecie di Salmonella, la S. enterica subsp. *enterica* (I) è la più comune e si trova prevalentemente associata ai mammiferi e presenta circa il 99% delle infezioni nell'uomo e negli animali a sangue caldo. D'altra parte, le altre cinque sottospecie di S. enterica *e* S. bongori sono rare nell'uomo e si trovano principalmente negli animali a sangue freddo e nell'ambiente.

Sono stati catalogati più di 2600 sierotipi, di cui la maggior parte appartenenti a sei sottospecie di *S. enterica*. Ciascun sierotipo è identificabile tramite un'unica regione variabile dell'antigene O del lipopolisaccaride (LPS) e delle proteine strutturali della flagellina. Il CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e le altre organizzazioni scientifiche hanno suggerito di mantenere, per *Salmonella enterica subsp. enterica*, il nome proprio della sierovariante, da cui, ad esempio, S.*enterica* O4, H i – 1,2 possa mantenere la denominazione di *S.enterica* serovar.Typhimurium, o più semplicemente *S.* Typhimurium.

Nell'ambito degli oltre 2.600 sierotipi (sierovarianti) di *S.enterica* repertati nell'ambiente o come ospiti di organismi animali e dell'uomo, è stata operata una distinzione tra sierotipi

ospiti-adattati, con il prototipo *S.typhi* (*S.enterica* subsp.*enterica* sierotipo Typhi), capaci di provocare febbre tifoidea e febbri tifo-simili e sierotipi ospiti-non adattati, quali *S.enterica* sierotipo Typhimurium, Enteritidis, Panama e altri, le cui proprietà patogene si traducono più frequentemente in episodi di enterite acuta, sporadici ed epidemici. Alcuni sierotipi hanno un *reservoir* unicamente umano (*S.typhi, S.paratyphi*). I meccanismi di adattamento possono rendere virulento un sierotipo per una particolare specie animale, rendendo lo stesso sierotipo meno o addirittura avirulento per un'altra specie animale. Si ritiene che il processo di adattamento dell'ospite da parte dei sierotipi di S. enterica possa coinvolgere due meccanismi: l'acquisizione di nuovi elementi genetici che codificano specifici fattori di virulenza e la delezione di geni.

*I sierotipi di* Salmonella non tifoidea (NTS) hanno una vasta gamma di ospiti e l'infezione umana, da parte di questi organismi, generalmente provoca una malattia diarroica autolimitante. Alcuni sierotipi NTS sono tuttavia tra le cause di infezioni del flusso sanguigno e di malattia invasiva (iNTS), rappresentando una minaccia particolare per individui immunocompromessi, compresi quelli infetti da HIV e malaria, e bambini che vivono in particolari aree geografiche, in cui la malnutrizione è comune.

Dati recenti provenienti da Stati Uniti, Paesi Europei e Paesi a basso e medio reddito indicano che i casi di *Salmonellosi* sono, a livello globale, la causa più comunemente riscontrata di malattie batteriche di origine alimentare. Ogni anno negli Stati Uniti si verificano circa 1,4 milioni di infezioni umane da *Salmonella*, con circa 16.000 ricoveri e 600 decessi. I sierotipi Typhimurium, Newport, Heidelberg, Hadar e Dublin sono attualmente elencati dal CDC come "i più pericolosi per la salute pubblica" a causa della loro frequente adulterazione di prodotti alimentari di carne bovina e pollame e della loro associazione con la resistenza multifarmaco. Si ritiene tuttavia che l'Africa subsahariana e l'Europa abbiano la più alta incidenza di malattia iNTS; per l'Europa ciò è dovuto principalmente a casi provenienti da Russia, Ucraina ed Estonia, con incidenze considerevolmente più elevate rispetto ai paesi dell'Europa occidentale. Negli ultimi anni sono stati segnalati diversi focolai mondiali di *Salmonellosi* (Canada, Pakistan, Australia, Stati Uniti, Giappone, Africa sub-sahariana, Brasile, India, Israele, Cile, Nuova Zelanda, Siria, Corea del Nord). Secondo report recenti del CDC, il più grande focolaio di *Salmonella* si è verificato negli Stati Uniti nel 2019, con 1134 casi segnalati, 219 ricoveri. In Europa, a partire dal 2007, il numero di casi di salmonellosi è diminuito, essendo state attuate diverse misure preventive riguardanti il controllo dei prodotti alimentari e l'igiene. Tuttavia, il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) riferisce che nel 2016 si è registrato un incremento del numero di focolai dovuti a S. Enteritidis, da Typhimurium e il coinvolgimento anche di sierotipi rari. In Europa, nel 2017, sono stati segnalati 92.649 casi di salmonellosi, di cui 156 decessi. I paesi che hanno segnalato un aumento del numero di casi sono stati Grecia, Estonia, Polonia, Portogallo, Slovacchia, Spagna, Francia, Belgio e Regno Unito.

Il principale serbatoio di *Salmonella* è l'intestino dell'uomo e degli animali, ma l'organismo è stato identificato anche nei rettili e negli insetti. Esiste un'ampia gamma di fonti di infezione tra cui le uova, la carne, i latticini, le verdure e l'acqua sono le più importanti. Nei paesi sviluppati la fonte più comune di infezione sono gli alimenti. I principali serbatoi delle forme non tifoidee sono gli animali domestici, da fattoria, selvatici e quelli esotici (tartarughe, iguana, ricci) ed i cibi ad essi correlati (uova e derivati). La trasmissione può anche avvenire da persona a persona per via oro-fecale. *Salmonella* spp. può causare vari tipi d'infezione, da gastroenteriti autolimitanti a quadri di febbre tifoide (febbre, batteriemia), ad infezione metastatica, o allo stato di portatore.

Dalle prime segnalazioni, all'inizio degli anni '60, la frequenza di isolamento dei sierotipi di Salmonella resistenti a uno o più antibiotici è aumentata a livello globale. Ciò è stato correlato all'uso improprio, all'uso eccessivo e alla facile accessibilità degli antimicrobici in molti paesi. Dal 2003, l'FDA ha riconosciuto la presenza di farmacoresistenza in Salmonella e in altre specie batteriche come una minaccia globale per la salute pubblica. In Salmonella la resistenza multifarmaco (MDR) è definita come resistenza verso i tradizionali antibiotici di prima linea come ampicillina, cloramfenicolo e trimetoprim-sulfametossazolo. Tra la fine degli anni '90 e l'inizio degli anni 2000 sono emersi *diversi cloni di* Salmonella multiresistente (MDR), con estensione delle *resistenze anche nei confronti di altri* antimicrobici clinicamente importanti come i fluorochinoloni e le cefalosporine di terza generazione*;* da allora la loro prevalenza negli esseri umani, negli animali domestici e in altre specie selvatiche si è espansa a livello globale.

Diversi paesi hanno elaborato regolamenti e linee guida, come il regolamento (CE) n. 2160/2003, la direttiva UE sul monitoraggio delle zoonosi (2003/99/CE) e il codice alimentare della Food and Drug Administration (FDA). Questi regolamenti e linee guida forniscono o richiedono informazioni sulla *Salmonella* e metodi di controllo, contribuendo a sviluppare norme di sicurezza alimentare e politiche di regolamentazione, al fine di ridurre i patogeni della *Salmonella* in qualsiasi fase della produzione di alimenti e mangimi.

I sintomi fanno la loro comparsa a 8-48 ore dall'ingestione. Le salmonellosi sono caratterizzate da diarrea, nausea, crampi addominali, per 4-7 giorni; può essere presente febbre che generalmente si risolve in 24-48 ore. Le feci inizialmente molli e acquose, presentano in 2ª-3ª giornata di malattia tracce di muco misto a sangue. Manifestazioni extraintestinali, quali, setticemie, artrite settica, infezioni delle vie urinarie, sono piuttosto rare (5%). Alcuni individui possono diventare portatori asintomatici per alcune settimane o mesi.

Le febbri tifoide e paratifoide sono malattie batteriche sistemiche causate da *S.*Typhi e *S.*Paratyphi A,B,C. In queste forme i microrganismi superano la lamina propria, vengono inglobati dai monocito-macrofagi e dai granulociti resistendo al *killing* fagocitario, raggiungono il sistema reticoloendoteliale (linfonodi mesenterici) e da qui il circolo ematico e linfatico, dando luogo a batteriemie sintomatiche o a manifestazioni settiche con o senza localizzazioni metastatiche. Gli uomini sono l'unico *reservoir* di questi batteri che possono essere portatori asintomatici, a breve o lungo termine. L'infezione è piuttosto infrequente nell'area europea risultando nella maggior parte dei casi d'importazione, in particolare dal Sudest asiatico. Febbre, malessere, anoressia, cefalea e vomito sono tra i più comuni sintomi delle febbri tifoidi che compaiono a 1-3 settimane dall'infezione. Possono anche essere presenti diarrea e lesioni maculopapulari di 2-4 mm. Una complicanza di febbri tifoidi non trattate è rappresentata dall'erosione della parete vasale nelle placche di *Peyer* con emorragia intestinale. Il microrganismo può persistere nei linfonodi mesenterici, nella colecisti e nel midollo per anni. Il 10% dei soggetti può avere una ripresa dei sintomi 2-3 settimane dopo la risoluzione. La severità del quadro clinico è dipendente, dalla carica infettante, dal sierotipo e da fattori dell'ospite. Una riduzione dell'acidità gastrica di varia natura predispone all'infezione.

Nelle salmonellosi gastroenteriche non tifoidee si verifica generalmente l'invasione della mucosa intestinale, con presenza di leucociti fecali e febbre. A differenza delle Salmonelle maggiori, hanno scarsa tendenza a diffondere nell'organismo e la patologia è tipicamente limita alla lamina propria del piccolo intestino. Le gastroenteriti da sierotipi

minori hanno incidenza prevalentemente estiva, sono tipiche zoonosi che hanno come fonte principale gli animali.

La gravità della malattia da *Salmonella* (salmonellosi) dipende da diversi fattori, come il sierotipo (tifoide, non tifoideo), la resistenza alla colonizzazione intestinale e l'immunosuscettibilità dell'ospite all'infezione intracellulare.

Attraverso vari studi è stato dimostrato che S. enterica, come molti altri batteri enteropatogeni, produce una varietà di determinanti di virulenza che svolgono vari ruoli nella patogenesi delle infezioni. Questi fattori, che includono flagelli, fimbrie, adesine, invasine, emoagglutinine, esotossine ed endotossine, sistemi di secrezione di tipo 3 (T3SS), vengono codificati sulle isole di patogenicità di Salmonella (SPI) e, singolarmente o in combinazione tra loro, consentono al *microrganismo* di colonizzare il suo ospite attaccandosi, invadendo, sopravvivendo e aggirando i meccanismi di difesa dell'ospite come l'acidità gastrica, le proteasi gastrointestinali e le defensine, nonché le aggressioni del microbioma intestinale. Ad oggi, sono stati segnalate diverse SPI per diversi sierotipi di Salmonella. *Le* SPI, localizzate su plasmidi o su cromosomi, svolgono ruoli diversi nella patogenesi. In breve, SPI-1 è necessaria per l'invasione delle cellule ospiti e l'induzione dell'apoptosi dei macrofagi, SPI-2 determinante per le infezioni sistemiche e la replicazione all'interno dei macrofagi, SPI-3 per la sopravvivenza nei macrofagi, SPI-4 coinvolta nelle fasi di secrezione di tossine e apoptosi, nonché della sopravvivenza intramacrofagica, SPI-5 per le codifiche di proteine effettrici del sistema T3SS ed SPI-6 coinvolta, in risposta a stimoli esterni, nel trasporto di proteine in ambiente cellulare o nelle cellule ospiti.

## *Shigella*

*Shigella species* sono adattate all'ospite umano anche se sono segnalati casi di isolamento da cani e da primati. L'infezione si contrae per ingestione di cibi o acque contaminate. Per la bassa carica infettante, è comune la trasmissione da persona a persona. La shigellosi ha una distribuzione universale, e stime recenti le attribuiscono circa 125 milioni di episodi diarroici all'anno con circa 160.000 decessi, di cui un terzo associati a bambini piccoli. L'incidenza è decisamente maggiore nei Paesi con condizioni igieniche più scadenti (*Shigella*, insieme a *Escherichia coli* enterotossigenico, è identificato come patogeno diarroico batterico predominante nelle popolazioni pediatriche dell'Asia meridionale e dell'Africa sub-sahariana). Analisi recenti mediante diagnostiche molecolari quantitative suggeriscono che il carico indotto da *Shigella* potrebbe decisamente superiore a quanto stimato in precedenza. Le quattro specie di *Shigella* (*S.dysenteriae*, *S.boydii*, *S.flexneri* e *S.sonnei*) e i loro vari sierotipi hanno distribuzione geografica e significato epidemiologico differenti. Le infezioni da *S. boydii* sono rare al di fuori del subcontinente indiano; *S. dysenteriae*, agente eziologico di molteplici epidemie fatali di dissenteria sin dal suo primo isolamento nel 1897, viene attualmente raramente isolata e il suo declino è probabilmente dovuto ai miglioramenti nei servizi igienico-sanitari e all'accesso antimicrobico. L'attuale carico epidemiologico globale per la shigellosi è attribuito a due specie, *S. flexneri* e *S. sonnei*, che erano convenzionalmente associate rispettivamente alle regioni in via di sviluppo e sviluppate. Tuttavia, prove recenti indicano l'emergere di *S. sonnei* in stati di transizione economica, sostituendo di fatto *S. flexneri* per diventare l'eziologia predominante della shigellosi. Le enteriti da *Shigella* si manifestano in tutte le età, ma colpiscono prevalentemente i bambini e circa il 70% dei casi si verificano in soggetti di età inferiore a 10 anni. L'infezione si manifesta con sintomatologia variegata, da una forma lieve con

diarrea liquida ad una grave con dissenteria ed emissione di feci con sangue, muco e pus. I differenti quadri clinici derivano dalla specie coinvolta, dai fattori di virulenza espressi dal microrganismo, in particolare le capacità invasive, e dalle condizioni immunitarie dell'ospite. Il periodo di incubazione è breve e la sintomatologia insorge bruscamente. Circa il 25-30% dei pazienti presenta una persistenza dei sintomi oltre i 14 giorni; fattori associati alla persistenza sono l'età, la febbre, la diarrea mucosa e il vomito; anche cefalea e rigidità nucale sono comuni (95, 39%). Quadri settici si manifestano principalmente in pazienti pediatrici con malnutrizione. Le complicanze sono rare e sono rappresentate da meningiti, encefalopatie, polmoniti ed infezioni urinarie, più frequenti con *S.sonnei* e *S.flexneri*. Possibili anche artriti reattive da *S.flexneri*. La sindrome emolitico-uremica (HUS) rappresenta una grave complicanza delle shigellosi (si manifesta in circa il 13% dei casi da *S.dysenteriae* tipo 1 ed è attribuibile all'espressione di *Stx*1) e interessa principalmente bambini sotto i 5 anni, prevalentemente in Asia ed Africa. Nelle shigellosi è raccomandato in genere il trattamento antibiotico per prevenire le complicanze e la diffusione dell'infezione. Il microrganismo, responsabile di invasione dell'epitelio del colon, con distruzione ed ulcerazione della mucosa, molto raramente supera questa barriera. La diffusione dell'infezione è generalmente limitata al rivestimento intestinale, dove porta a infiammazione del colon, ulcerazione della mucosa e perdita della funzione di barriera intestinale. Ad eccezione di alcune forme particolarmente gravi da *S.dysenteriae* (bambini denutriti, persone anziane), l'infezione da *Shigella* è generalmente autolimitante (S.*flexneri, S.boydii, S.sonnei*). Le shigelle hanno come unico serbatoio l'uomo. La trasmissione è oro-fecale (fomiti, mani, mosche), favorita dalla bassa carica infettante (qualche centinaio di batteri) e dalla resistenza a bassi valori di pH. Anche l'acqua e i cibi contaminati possono essere veicoli d'infezione. L'azione patogena di *Shigella* è dovuta alle capacità invasive nei confronti dell'epitelio intestinale e alla produzione di endotossine ed esotossine. Le capacità invasive delle shigelle si manifestano a livello del colon e dell'ultimo tratto dell'ileo. Il processo infettivo iniziale di *Shigella* è l'induzione della piroptosi dei macrofagi, che consente il rilascio di batteri invasori. In breve, il batterio attraversa l'epitelio attraverso le cellule M e induce la fagocitosi da parte dei macrofagi nella sottomucosa. I microrganismi attivano rapidamente la morte dei macrofagi e interagiscono con la superficie basolaterale dell'epitelio, innescandone l'assorbimento attraverso la riorganizzazione del citoscheletro della cellula ospite. In pratica, una volta che il batterio è penetrato nella cellula mediante endocitosi e dopo che i vacuoli sono andati incontro ad un processo di lisi, le cellule infettate producono protrusioni membranose che contengono microrganismi e che si inseriscono nelle cellule adiacenti, dove vengono fagocitate. In tal modo si realizza una diffusione continua del batterio a livello della mucosa, con evidenti alterazioni morfo-strutturali delle cellule e degli scambi idroelettrolitici, non disgiunti, questi ultimi, dall'intervento di elementi flogistici. Al centro di questi meccanismi patogenetici si colloca il grande plasmide di virulenza, che codifica per il sistema di secrezione di tipo III (T3SS), una siringa molecolare ancorata nella parete cellulare batterica, e un arsenale di proteine effettrici, inclusi diversi antigeni plasmidici di invasione. Il sistema di secrezione di tipo III permette il passaggio delle molecole dal citoplasma batterico al citoplasma eucariotico grazie alla formazione di pori sulla membrana della cellula eucariotica da parte del sistema IpaB/IpaC di *Shigella*. Le shigelle superano lo strato epiteliale e si localizzano nella lamina propria, dando luogo ad un processo infiammatorio caratterizzato dalla presenza di numerosi polimorfonucleati e spesso provocano anche infiltrati leuco-plasmacellulari a livello della sottomucosa con formazione di piccoli ascessi con conseguenti zone di necrosi e piccole ulcerazioni

sanguinanti. La distruzione delle cellule determina la formazione di ulcere, senza il superamento della lamina propria, con elevata reazione infiammatoria. Altri fattori di virulenza, corrispondenti a *loci* cromosomici, sono rappresentati in primo piano dalla tossina-Shiga (*Sh.dysenteriae*) e da due enterotossine (ShET1, ShET2), di cui ShET-1 è presente solo in *Sh.flexneri. S.dysenteriae* sierotipo 1 causa una forma particolarmente severa per la produzione di una tossina Shiga, con possibile evoluzione in una sindrome emolitico-uremica. La tossina citotossica provoca rapida degenerazione e necrosi degli elementi cellulari. In questi ultimi decenni Shigella ha evidenziato la capacità di acquisire geni di resistenza che la rendono insensibile a chemioterapici quali sulfonamidi, tetracicline, ampicillina e cotrimossazolo. La situazione si è ulteriormente aggravata recentemente per la comparsa di ceppi multi resistenti in tutto il mondo.

## *Campylobacter*

*Campylobacter* rappresenta una delle maggiori cause di enterite infettiva nell'uomo. La campilobatteriosi è l'infezione gastrointestinale più comunemente segnalata negli esseri umani nell'UE e lo è dal 2005. Anche nel 2020 si conferma la zoonosi più frequentemente segnalata nell'UE (120.946 casi), corrispondente a un tasso di notifica UE di 40,3 per 100.000 abitanti, con una diminuzione del 33,4% rispetto al tasso del 2019, probabilmente da correlare alla pandemia di COVID-19. Tuttavia, la tendenza complessiva della campilobatteriosi nel 2016-2020 non ha mostrato un aumento o una diminuzione statisticamente significativo. Nel 2020, il *Campylobacter* è stata la quarta causa più frequente di focolai di origine alimentare segnalata da 17 Stati membri a livello dell'UE. Per il CDC *Campylobacter* provoca circa 1,5 milioni di casi di malattia ogni anno negli Stati Uniti, anche se l'incidenza reale è probabilmente superiore in relazione ai casi non diagnosticati o riportati.

In generale, le infezioni da Campylobacter sono più comuni nei bambini (sotto i 4 anni) e gli anziani (sopra i 75 anni). Tra le persone a rischio maggiore di infezione rientrano gli immunocompromessi, i pazienti con emoglobinopatie e coloro che soffrono di malattie infiammatorie intestinali. Massima incidenza stagionale all'inizio dell'estate. Il periodo di incubazione è generalmente di 2-5 giorni ma può raggiungere i 10. La maggior parte dei casi è sporadica e rari risultano essere gli eventi epidemici che sono generalmente associati al consumo di latte crudo o di acque contaminate.

La trasmissione dell'infezione*, attraverso* la via fecale-orale, contempla il consumo di carni poco cotte (pollame) e contaminate o il consumo di alimenti, tra cui il latte non pastorizzato, vegetali crudi e acque contaminati*.* È probabile che oltre l'acqua anche il terreno contaminato possa giocare un ruolo nella trasmissione agli esseri umani. Gli animali, in particolare gli uccelli, sono il serbatoio (*reservoir*) naturale di *Campylobacter*, che generalmente abita il tratto intestinale di animali da allevamento (polli, bovini, suini) e domestici (cani e gatti). Questi batteri vengono rilasciati nelle feci di questi animali nell'ambiente. Le persone che lavorano con animali da allevamento sono ad alto rischio d'infezione *(*lavoratori delle fattorie e dei mattatoi). La maggior parte dei focolai sono causati dal consumo di carne di pollame e prodotti a base di pollame (le carni di pollame e il suo prodotto causano circa il 60-80% dei casi globali di campilobatteriosi). La carne si contamina generalmente durante la macellazione.

*Campylobacter jejuni* e *C.coli* sono riconosciuti tra le specie più comuni di infezioni gastrointestinali e *C.jejuni* è responsabile di più del 90% dei casi. Le infezioni causate da C. jejuni possono manifestarsi con sintomatologia di diversa entità, da una diarrea lieve e autolimitante, a forme più gravi con crampi addominali, febbre e diarrea

sanguinolenta con muco, alla colite emorragica. La comparsa dei sintomi occorre generalmente dopo 2-7 giorni dall'ingestione dei cibi contaminati. Prima della comparsa della diarrea compare febbre con malessere, dolore addominale e possibile mialgia. La diarrea è caratterizzata da feci molli acquose, con o senza sangue. Generalmente la diarrea è auto-limitante e i sintomi scompaiono dopo una settimana, in assenza di terapia. In assenza di trattamento, il 5-10% dei soggetti ha una ripresa dei sintomi. Raramente le infezioni possono divenire invasive, in particolare nei neonati e negli anziani (batteriemie transitorie, sepsi) ed occasionali possono essere le sequele (artrite, endocardite, sepsi neonatale), incluse nella cosiddetta sindrome di *Reiter*. In alcuni casi possono manifestarsi complicanze al sistema nervoso di natura autoimmune: sindrome di *Guillain Barré* (demielinizzazione acuta post-infettiva sistema nervoso periferico) e sindrome di *Miller-Fisher* (SNC e nervi cranici) e la malattia infiammatoria intestinale (IBD). C. jejuni può anche essere associato a complicanze immunoreattive come la sindrome di Miller-Fisher. C. coli è la seconda specie di Campylobacter segnalata quale causa d'infezione umana. Le manifestazioni cliniche delle infezioni da C. coli comprendono diarrea acquosa, dolore addominale, vomito, febbre, malessere e nausea. Tra le specie termotolleranti implicate in infezioni gastrointestinali vanno segnalati anche *C.fetus*, responsabile principalmente di aborto settico negli animali da allevamento, C. lari, riportato per la prima volta in pazienti immunocompromessi, ora segnalato in casi sporadici tra cui epidemie *trasmesse dall'acqua e* C. upsaliensis, riconosciuto come un patogeno diarroico emergente clinicamente importante sia in ambito pediatrico che in soggetti immunocompromessi. La maggior parte delle specie associate a malattia nell'uomo sono termofile, crescendo a 43° e 37°C ma non a 25°C.

*Alla patogenicità del* Campylobacter contribuiscono vari fattori di virulenza che includono proprietà adesive ed invasive, produzione di tossine (enterotossina termolabile colera-simile, citotossine), motilità mediata da flagelli, acquisizione di ferro, a cui aggiungere la capacità di resistenza allo stress ossidativo e in generale a stress fisiologici, e la capacità di rimanere in uno stato vitale non coltivabile. Sebbene infatti *C.jejuni* sia un microrganismo microaerofilo, incapace di crescere ai livelli atmosferici di ossigeno, è in grado di sopravvivere nell'ambiente mostrando aerotolleranza. La formazione di biofilm, così come lo stato vitale non coltivabile e l'interazione con altri microrganismi sono altri fattori che giustificano la sopravvivenza ambientale del microrganismo.

*La chemiotassi e* il sistema di motilità legata ai flagelli sono i due importanti fattori di virulenza che aiutano a portare questi batteri al loro sito di colonizzazione, contribuendo anche alle fasi invasive nella cellula ospite. Esistono molti geni di virulenza coinvolti nel meccanismo di colonizzazione ed invasione e questi geni vengono trasportati nel citoplasma della cellula ospite con l'ausilio del sistema di secrezione dei flagelli.

## *Yersinia enterocolitica*

*Yersinia enterocolitica* è un patogeno enterico responsabile di forme cliniche anche gravi, specialmente in età giovanile e negli anziani, con possibili sindromi post-infettive e complicanze su base autoimmunitaria. Le infezioni di origine alimentare continuano a rappresentare un problema di salute pubblica in molti Paesi del mondo e la yersiniosi provocata da Y. enterocolitica è al terzo posto tra le malattie di origine alimentare nell'Unione Europea. La specie è suddivisa in 6 biovarianti (1A, 1B, 2, 3, 4, e 5) e, in base agli antigeni somatici, può essere ripartita in sierogruppi (70) che tuttavia presentano una patogenicità eterogenea. In base al sequenziamento del gene 16S rRNA, sono state differenziate due sottospecie, *Y.enterocolitica* subsp. *enterocolitica* e *Y.enterocolitica*

subsp. *paleartica*. L'infezione è una zoonosi causata da alcuni sierogruppi di *Y.enterocolitica* (O3, O9, O5, O8, O27). *Y.enterocolitica* subsp. *paleartica* O:3/4 è il sierotipo dominante nel mondo. L'incidenza di infezione enterica risulta estremamente variabile nelle diverse aree geografiche (dall'1% sino al 30%), in corrispondenza di particolari situazioni endemiche. I quadri clinici più comuni sono rappresentati da enterocolite emorragica, ileite terminale, linfoadenite mesenterica (sindrome pseudoappendicolare), setticemia con focolai infettivi extraintestinali. I bambini, specialmente quelli più piccoli (< 4 anni), sono colpiti più frequentemente da yersiniosi con diarrea. Le forme pseudo appendicolari sono più frequenti tra i 5 e 15 anni. Possono essere presenti sequele immunologiche su base autoimmunitaria (eritema nodoso, artrite reattiva). L'incubazione è compresa tra 4 e 7 giorni. Il *reservoirs* naturale di *Y.enterocolitica* è rappresentato da numerose specie di animali, quali cavie, roditori, conigli e suini (tessuto linfatico dell'orofaringe). Il germe è trasmesso per ingestione di cibi o acque contaminate, per trasmissione oro-fecale. L'assunzione di carne di maiale poco cotta o cruda è il principale fattore di rischio di yersiniosi in Europa. Le epidemie di origine alimentare sono collegate a molteplici prodotti alimentari, tra cui latticini, carne, pollame, frutta, verdura, prodotti in umido e fermentati e anche frutti di mare. È un germe resistente al freddo (si può riprodurre a 0-2°C), dando malattie specialmente in zone geografiche fredde o nei mesi invernali. La propagazione di Y. enterocolitica a basse temperature permette di sopravvivere e riprodursi anche negli imballaggi sottovuoto e negli alimenti refrigerati.

La patogenesi è complessa con intervento di una componente adesinica, una componente invasinica e tossinogenica. La cellula batterica infetta l'intestino tenue a livello dell'ileo terminale e del colon prossimale, considerati i siti primari d'infezione. Si presume che i batteri utilizzino alcuni fattori genici di virulenza per colonizzare l'intestino, facilitando il legame delle cellule batteriche alla mucosa con invasione delle cellule M. I batteri intrappolati vengono quindi liberati dalle cellule M nello strato basale della lamina propria e, dopo essersi moltiplicati nei follicoli linfatici, possono diffondere alle placche di Peyer e da qui ai linfonodi mesenterici, causando linfoadenite. Le enterotossine prodotte da Yersinia, aumentando il livello di cGMP, favoriscono la secrezione di liquidi nel lume intestinale. L'azione del microrganismo porta alla formazione di ulcere nell'ileo terminale, con fenomeni necrotici nelle placche del *Peyer* ed ingrossamento dei linfonodi mesenterici. La sintomatologia è caratterizzata da febbre, crampi addominali (specie in corrispondenza della fossa iliaca dx così da mimare un episodio di appendicopatia acuta), diarrea acquosa ed ematica, spesso con muco. I quadri clinici variano da forme auto-limitanti di enterite con diarrea, febbricola e dolore addominale a forme gravi con ileite terminale con linfadenite mesenterica (sindromi simil-appendicolari) che si manifestano 24-48 ore dopo l'ingestione e della durata di 7-14 giorni, con possibilità di persistenza della sintomatologia fino a due mesi. Le principali sequele dell'infezione da *Y.enterocolitica* sono l'artrite reattiva e l'eritema nodoso, che compaiono circa 3 settimane dopo l'enterite. Anche *Y.pseudotuberculosis* è enteropatogena ma è più comunemente associata a quadri di sepsi e di adenite mesenterica con sindrome simil-appendicolare. *Y.enterocolitica* e *Y.pseudotuberculosis* possono essere isolate da animali (lepri,roditori, cani, gatti, uccelli) alimenti e fonti ambientali (suolo, acqua, liquami).

## *Vibrio*

Il genere *Vibrio* è costituito da numerose specie, di cui talune in grado di provocare nell'uomo forme più o meno gravi di enteropatia. Il genere *Vibrio* comprende oltre 60 specie. Alcune specie tradizionalmente associate a questo genere sono state

recentemente riclassificate in raggruppamenti filogeneticamente separati (*Vibrio-like*), come *Grimontia hollisae* (*Vibrio hollisae*). Solo poche specie del genere vengono associate a gastroenteriti batteriche, di cui *V.cholerae* e *V.parahaemolyticus* sono i principali rappresentanti. Altre specie, meno frequentemente segnalate, sono *V.mimicus, V.fluvialis, V.vulnificus* e *G.hollisae*. *Vibrio* e batteri *Vibrio*-correlati sono largamente distribuiti in ambiente acquatico, essendo abitanti delle acque salate e salmastre in tutto il mondo. Anche acque fresche con basse concentrazioni di sali possono consentire la crescita di specie non alofile, come *V.cholerae* e *V.mimicus.* Per l'associazione con l'ambiente marino, *Vibrio* spp. può trovarsi anche negli abitanti di questo macrosistema, inclusi i molluschi. Il rappresentante più autorevole del genere, *V.cholerae*, comprende il biotipo classico (6 sierogruppi, 190 sierotipi), o sierogruppo O1 e il biotipo El Tor, capaci di determinare forme epidemiche e non infrequentemente pandemiche di diarrea umana. I sierogruppi El Tor e O139 sono responsabili delle attuali pandemie di malattia colerica. WHO (*World Health Organization*) stima che oltre 1,4 bilioni di persone al mondo sono a rischio di contrarre infezione colerica, con circa 2,8 milioni di casi all'anno, con circa 130.000 morti. *Vibrio cholerae* è patogeno solo per l'uomo e il suo veicolo di trasmissione è costituito da materiale fecale contaminante alimenti (pesci o crostacei) o sorgenti idriche. Ne consegue che la malattia è concentrata in aree dove esiste una grave carenza di condizioni igieniche tali da favorire il diffondersi della malattia per via principalmente orofecale. Il colera ha ancora come principale focolaio endemico l'India, nella regione del delta del Gange ma è presente in forma endemico-epidemica in altri paesi dell'Asia, Africa e America centro-meridionale. Attualmente la più alta incidenza di colera si trova in Africa e nelle regioni meridionali asiatiche. Epidemie di colera sono comuni in numerosi Paesi in via di sviluppo con una costante espansione in regioni africane e caraibiche. La trasmissione prevalente è uomo-uomo, con varie modalità di passaggio oro-fecale, tra cui domina quella che ha come veicolo l'acqua. Il periodo d'incubazione varia da poche ore ad alcuni giorni (18 ore- 5 giorni). Unicamente i sierogruppi O1 e O139 sono responsabili della forma epidemica dell'uomo, producendo la tossina colerica. Tutti gli altri sierotipi (190) indicati come NAG (non agglutinanti) sono invece associati a episodi di gastroenterite non epidemica. La manifestazione morbosa viene fatta risalire all'intervento di un determinato numero di fattori di virulenza che consentono al batterio di penetrare attraverso lo strato mucoso che tappezza l'intestino tenue, di aderire all'epitelio e promuovere il quadro clinico. Tra questi vi è la tossina CT o enterotossina in grado di determinare, attraverso un aumento di adenosina-3,5-monofosfato ciclico (cAMP), l'attività secretoria di anioni cloruro e bicarbonato e di cationi sodio e potassio (Na, Cl, K, $HCO_3$ e $H_2O$) dalle cellule della mucosa nel lume intestinale. Questi ioni determinano, per richiamo osmotico, un afflusso passivo di un gran volume di acqua, che, nei casi più gravi, può corrispondere alla emissione di parecchi litri giornalieri. Le forme più severe sono associate ai ceppi pandemici che portano una serie di geni legati a fattori di virulenza. La sintomatologia del colera è caratterizzata da perdite elevate di liquidi con disidratazione e squilibrio elettrolitico, con feci ad acqua di riso (fiocchi di muco), crampi muscolari, ipotensione, apatia, collasso. Le forme causate da sierogruppi non O1 e non O139 sono generalmente di media entità o autolimitanti, poiché mancano di geni tossinogenici. Per la costante esposizione all'agente infettante, una colonizzazione asintomatica è relativamente comune in aree endemiche. Di recente, è stato fatto osservare che talune specie di vibrioni appartenenti alla normale microflora marina, se messe nelle condizioni di potersi moltiplicare, possono determinare infezioni del tratto gastroenterico. *V.parahaemolyticus*, batterio alofilo che produce una enterotossina responsabile di flogosi della mucosa del piccolo intestino, è responsabile di molte

gastroenteriti epidemiche di origine alimentare. Un clone, l'O3:K6, ha una diffusione pandemica ed è responsabile di gastroenteriti in tutto il mondo (Giappone, America del Nord, centrale e del Sud, subcontinente indiano, parte dell'Africa e l'Europa). *Vibrio parahaemolyticus* e sembra essere la causa della maggior parte degli avvelenamenti alimentari di provenienza marina e il 20% delle diarree. I sintomi più frequenti legati all'enterite da *V.parahaemolyticus* sono la diarrea con crampi addominali, nausea e vomito; in una buona percentuale di casi è presente febbre. A differenza di quanto si verifica per altri patogeni enterici, le complicanze sono molto rare. L'incidenza di vibriosi è segnalata in aumento, anche in Paesi dove il colera non è comune, come negli Stati Uniti. Anche *V.mimicus* è tra i responsabili di epidemie di malattia diarroica, così come *V.fluvialis,* responsabile nel 2010 di un focus epidemico in una regione costiera dell'India orientale dopo il passaggio del ciclone Aila. Oltre la malattia diarroica, questi vibrioni possono provocare setticemie, infezioni di ferite e otiti esterne.

## *Aeromonas*

Il genere *Aeromonas,* appartenente alla famiglia delle *Aeromonadaceae,* comprende un gruppo di batteri Gram-negativi ampiamente distribuiti negli ambienti acquatici (acque di superficie, sotterranee, residue, marine e di irrigazione), facilmente isolabili da animali come uccelli, rettili, anfibi, pesci e crostacei. La capacità di adattamento rende *Aeromonas* in grado di colonizzare anche gli ambienti terrestri, da cui la possibilità di isolamento da diverse fonti, come suolo, piante, frutta, verdura, latticini, carni e salsicce. Diverse specie (attualmente il genere ne comprende 36) sono in grado di causare malattie nell'uomo, nei pesci e in altri animali acquatici e alcune di esse sono considerate agenti patogeni emergenti in quanto responsabili di un ampio spettro di malattie nell'uomo, principalmente gastroenteriti, infezioni delle ferite e batteriemia/setticemia, potendo infettare sia soggetti immunocompromessi che immunocompetenti. Le specie più comuni legate all'infezione umana includono A. hydrophila, A. caviae complex e A. veronii complex *(*A. veronii biovar veronii, A. veronii biovar sobria) e A. dhakensis, che rappresentano circa il 96% dei casi di gastroenterite.

L'incidenza globale di gastroenteriti *Aeromonas*-associate su base globale, varia enormemente in relazione a fattori geografici, socioeconomici e alle potenzialità diagnostiche. Nei Paesi in via di sviluppo l'incidenza di diarrea da *Aeromonas* riportata varia dal 4 al 22%. Nei paesi industrializzati l'incidenza varia dallo 0 al 10%.

Le manifestazioni gastroenteriche, generalmente conseguenti all'assunzione di alimenti o acque contaminati, variano dalla diarrea acquosa acuta (più comune), alla forma invasiva ematica, con presenza di PMN nelle feci, alla dissenteria o alla malattia gastrointestinale cronica. La presentazione clinica più frequente è la forma acquosa secretoria. I sintomi di accompagnamento includono dolore addominale e occasionalmente febbre, vomito e nausea. Gastroenteriti *Aeromonas*-associate interessano prevalentemente bambini sotto i 5 anni ("*summer diarrhea*"). Le forme acute sono generalmente autolimitanti e non richiedono una terapia antimicrobica di supporto ma piuttosto idratazione e sostegno elettrolitico. Sono segnalati casi in cui a seguito di gastroenterite da *Aeromonas* possono derivare gravi complicanze quali colite ulcerosa, colite diffusa, o malattia infiammatoria intestinale. Sono stati riportati pochi casi di sindrome emolitico uremica (HUS) associati a *A.hydrophila* o *A.veronii* sia in bambini che adulti.

L'enterite batterica origina comunemente dall'ingestione di alimenti contaminati (carne, pollo e, soprattutto, pesce). La patogenesi di *Aeromonas* è complessa, poiché diversi fattori contribuiscono in modo significativo allo sviluppo di un processo

infettivo. Componenti strutturali, tossine e prodotti extracellulari, agendo congiuntamente o individualmente, consentono a questi microrganismi di colonizzare e infettare gli ospiti. Le manifestazioni cliniche sono dunque legate all'azione di diversi fattori di virulenza, quali lipasi, proteasi, emolisine, aerolisine, citotossine ed enterotossine, che contribuiscono sia alla sopravvivenza e all'adattamento ambientale del microrganismo, che alla complessa e multifattoriale patogenesi. Tra i principali fattori di virulenza sono da considerare diversi tipi di tossine che Aeromonas è in grado di produrre, tra cui enterotossine citotossiche ed enterotossine citotoniche. L'enterotossina citotossica promuove la degenerazione dei villi e delle cellule che producono muco, generalmente correlata a casi di diarrea sanguinolenta nell'uomo. A differenza delle enterotossine citotossiche, le enterotossine citotoniche termolabili e termostabili, non provocano danni degenerativi dell'epitelio intestinale ma promuovono, attraverso l'aumento dell'AMP ciclico nelle cellule intestinali, la secrezione di liquidi nell'ileo, correlandosi a casi di diarrea non ematica. La capacità di produzione di tossine Shiga 1 e 2 da parte di Aeromonas è variabile. La possibile evoluzione verso HUS è attribuibile a questi fattori di virulenza.

## *Plesiomonas*

Oggi Plesiomonas è considerato un enteropatogeno dalla maggior parte delle comunità mediche e scientifiche. Il genere Plesiomonas è costituito da un'unica specie, Plesiomonas shigelloides, un bacillo Gram-negativo appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae.

Le plesiomonadi sono mesofili con temperature di crescita comprese tra 8°C e 45°C. La temperatura ottimale per la crescita della maggior parte dei ceppi è compresa tra 35°C e 39°C. P. shigelloides è un abitante comune degli ambienti acquatici, specialmente nelle regioni tropicali e subtropicali, comprese le acque dolci e salate. Anche gli abitanti di tali ecosistemi, inclusi pesci, molluschi e crostacei, uccelli acquatici, mammiferi marini, anfibi, rettili, così come i terreni associati agli ambienti acquatici, sono colonizzati da questo microrganismo. P. shigelloides può essere incorporato in vari prodotti alimentari che sono da considerare, assieme all'acqua, veicoli di trasmissione: il consumo di pesce e crostacei crudi o poco cotti è considerato uno dei principali fattori di rischio di infezione.

Le conoscenze sull'associazione di P. shigelloides con infezioni umane sono al momento rivolte principalmente alla malattia diarroica con casi documentati *a* distribuzione mondiale. La maggior parte dei casi sono sporadici e le infezioni hanno un aspetto stagionale con netta prevalenza di malattie durante i mesi più caldi. Ad oggi sono anche documentati focolai epidemici, di cui alcuni (Giappone) con prove microbiologiche ed epidemiologiche molto forti a sostegno dell'enteropatogenicità di questo batterio. È opinione comune che ci sia una sottovalutazione generale dell'incidenza delle infezioni da Plesiomonas in relazione alla condivisione delle manifestazioni cliniche con altri agenti patogeni e per una sottostima di indagine microbiologica.

*L'enterite da* Plesiomonas può presentarsi in una delle tre forme seguenti: gastroenterite secretoria acuta (più comune), colite sanguinolenta o dissenterica o diarrea cronica o persistente di durata >14 giorni. La diarrea acquosa è la presentazione clinica più comune (50% e l'88%). I principali sintomi associati comprendono diarrea acquosa e dolore addominale. La dissenteria o colite infettiva è la seconda forma più comune di gastroenterite ed è caratterizzata dalla comparsa macroscopica di sangue nelle feci accompagnata da dolore addominale o dolorabilità e vomito, associata talvolta a febbre. Il muco nelle feci si trova nel 17-19% delle feci. In soggetti immunodepressi *P.shigelloides*

può passare nel sangue, causando osteomieliti, artriti settiche, sepsi. P. shigelloides è anche riconosciuta quale causa rara di diarrea cronica. Le infezioni miste sono abbastanza frequenti (dal 16% al 28%), con comuni patogeni coinfettanti tra cui Salmonella, Aeromonas e V. parahaemolyticus.

L'enteropatogenicità di P. shigelloides continua ad essere piuttosto nebulosa, ma è da tempo accettato che la manifestazione della malattia nell'ospite sia multifattoriale. Sono chiamati in causa come fattori di patogenicità la motilità flagellare, la produzione di lipasi, elastasi, gelatinasi, proteinasi che consentono ai batteri di abbattere le proteine della matrice cellulare, portando all'invasione dei tessuti e alla diffusione dell'infezione, la produzione di enterotossine, tossine colera-simili e citotossine.

La maggior parte delle infezioni gastrointestinali causate da P. shigelloides sono sono auto-limitanti e non richiedono un intervento antimicrobico o altri trattamenti medici. Il trattamento dell'infezione da P. shigelloides consiste generalmente nella reidratazione orale. Nei casi più gravi è raccomandato l'uso di antimicrobici come norfloxacina, trimetoprim, azitromicina, ceftriaxone o ciprofloxacina. Negli ultimi anni è stato segnalato l'isolamento di *stipiti* resistenti a numerosi antimicrobici, molti dei quali utilizzati nel trattamento delle infezioni.

## *Listeria*

Il genere Listeria è composto da 6 specie, di cui *L.monocytogenes* è la specie patogena più comune nell'uomo, potendo causare infezioni intestinali ed extraintestinali. *L.monocytogenes* è un comune abitante del terreno, della vegetazione e degli animali. Poiché può sopravvivere in ambiente acido o ricco di sali negli alimenti e a temperature di refrigerazione (4°C), ha la possibilità di sopravvivere e moltiplicarsi su un gran numero di cibi refrigerati. FDA riporta una contaminazione elevata (32%) di alimenti da parte di *L.monocytogenes* anche se il rischio di gastroenterite è subordinato ad un alto livello di contaminazione ($10^7$-$10^9$ CFU/g). L'incidenza di gastroenterite da *L.monocytogenes* è sconosciuta essendo i dati sulla *Listeria* focalizzati sulle forme sistemiche. Molti pazienti con listeriosi invasiva hanno un'anamnesi positiva per sintomi gastrointestinali e questo dato, associato a segnalazioni di epidemie da *L.monocytogene,* suggerisce l'ipotesi tale microrganismo possa essere causa infrequente di gastroenterite con coprocoltura negativa.

Il periodo di incubazione tipico è di 24 ore anche se può variare da 6 ore a 10 giorni. Una volta comparsi i sintomi, la diarrea dura circa 3 giorni. Si accompagna a febbre, cefalea, artralgie e mialgie. Raramente compaiono disturbi quali dolore addominale, nausea, vomito, vertigini, linfoadenopatia e *rush* cutaneo. Complicanze serie sono le forme invasive che includono setticemia e meningite. *L.monocytogenes* manifesta un tropismo per il cervello da cui encefaliti, tromboencefaliti e ascessi cerebrali. Fattori di rischio includono acidità gastrica, l'uso di antiacidi e di lassativi.

# EZIOLOGIA - SCHEDE TECNICHE

# BATTERI ASSOCIATI A TOSSINFEZIONI ALIMENTARI

## *Clostridium perfringens*

*C.perfringens* rappresenta uno dei batteri più diffusi con una distribuzione ambientale ubiquitaria nel suolo, nelle acque fognarie e può essere riscontrato nelle feci umane ed animali. Il microrganismo è tuttavia anche uno dei più comuni patogeni umani ed animali con differenti quadri clinici. Il microrganismo può utilizzare il suo arsenale di più di 16 tossine per causare infezioni intestinali e lesioni tessutali. Responsabile di gangrene gassosa di origine traumatica, *C. perfringens*, rappresenta una delle principali cause di malattie di origine alimentare, collocandosi ai primi posti quale causa di tossinfezioni alimentare. Questo batterio rappresenta circa un milione di casi ogni anno solo negli Stati Uniti, al terzo posto, dopo Campylobacter spp. e Salmonella spp. non tifoidea. Il microrganismo è coinvolto in epidemie di origine alimentare in tutto il mondo e la maggior parte dei focolai deriva da cibi poco cotti, da scarsa igiene, risultando quali principali veicoli di trasmissione il pollame e i prodotti a base di carne. La tossinfezione alimentare da *C.perfringens* è conseguente all'ingestione di cibi contaminati da spore (carne o alimenti a base di carne, o da altro materiale non opportunamente cotto) che germinano in seguito alla scorretta conservazione. In aggiunta il batterio è responsabile di circa il 5–15% dei casi di diarrea associata ad antibiotici ed è anche responsabile di una patologia umana neonatale, spesso fatale, l'enterite necrotizzante (NEC). L'intossicazione richiede l'ingestione di alte cariche del microrganismo. Come patogeno animale, C. perfringens è responsabile di diverse gravi malattie, tra cui l'enterite necrotica aviaria.

La virulenza di C. perfringens deriva in gran parte dalla sua prolifica capacità di produrre tossine. Sulla base della produzione di quattro principali tossine (alfa, beta, epsilon e iota), questo organismo è comunemente classificato in uno dei cinque tipi (da A a E). Alcuni ceppi di C. perfringens producono un'altra importante tossina, un'enterotossina (CPE), che è responsabile di diverse malattie gastrointestinali umane (GI), tra cui l'intossicazione alimentare, molti casi di diarrea associata ad antibiotici (AAD) e diarrea sporadica.

Gli stipiti di C. perfringens (tipo A) che producono l'enterotossina (CPE) sono una causa di tossinfezioni alimentare. In seguito alla germinazione delle spore di stipiti tossinogenici liberano l'enterotossina nel lume intestinale del piccolo intestino. CPE, proteina di circa 35-kDa, appartiene alla famiglia di tossine formanti β-pori. In seguito all'azione di queste tossine viene alterata la permeabilità delle membrane cellulari che comporta un forte afflusso di ioni calcio, con perdita di potassio intracellulare, che causa morte cellulare per apoptosi. La morte degli enterociti altera l'integrità dei villi causando danni intestinali e disregolazione elettrolitica. I sintomi includono crampi addominali, nausea e diarrea, di norma senza febbre e vomito, che generalmente inizia 8–18 h dopo l'ingestione di cibi contaminati e poi persistono per 12–24 h. Solo circa l'1–5% di stipiti di *C. perfringens* tipo A trasportano geni *cpe*.

Gli stipiti di *C. perfringens* tipo C sono in grado di causare malattie fulminanti sia nell'uomo che in animali. Nell'uomo tale infezione causa enterite necrotizzante (NEC), infezione intestinale caratterizzata da vomito, feci ematiche, dolore addominale e nei casi più severi, tossiemia e morte. Enterocolite necrotizzante è tra le più comuni malattie acquisite che colpiscono il sistema gastrointestinale dei neonati, in particolare i bambini a basso peso alla nascita. Queste infezioni sono endemiche nel sud-est asiatico. La

produzione di tossine a livello dell'epitelio intestinale (digiuno, ileo e, in misura minore, duodeno e colon), provoca accumulo di liquidi e necrosi, con livelli variabili di emorragia. L'azione necrotizzante è legata a due tossine, α e β, nonché una enterotossina, comune a quella di *C.perfringens* tipo A. Tuttavia le tossine associate a malattia intestinale variano nella loro specificità *target* e alla sensibilità alle proteasi intestinali. La produzione di molte tossine con differenti caratteristiche conferisce di conseguenza una flessibilità di virulenza che può determinare una serie notevole di patologie.

Al momento, l'identificazione primaria di C. perfringens da campioni fecali si basa sull'utilizzo di terreni microbiologici selettivi e sistemi di identificazione biochimica o spettrometrica. La conferma finale dei ceppi tossigeni può essere integrata, se necessario, da test specializzati, tra cui test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), analisi sierologiche, agglutinazione al lattice passiva inversa (RPLA) o saggio cellulare Vero.

Poiché le tossine sono i principali agenti eziologici per lo sviluppo di malattie negli animali e nell'uomo, il loro rilevamento diretto dai campioni può rappresentare un'altra importante opzione per diagnosticare una malattia o indagare sulla prevalenza di C. perfringens. Il sequenziamento dell'intero genoma e di alcuni grandi plasmidi-trasportanti *cpe*, hanno portato allo sviluppo di approcci molecolari per indagare isolati coinvolti in malattie gastrointestinali umane e isolati presenti nell'ambiente. Allo stato attuale la letteratura scientifica avrebbe dimostrato l'insufficiente accuratezza diagnostica delle NAAT, come singolo test diagnostico, per una sostituzione degli standard di riferimento tradizionali. La NAAT può essere tuttavia applicata in combinazione con la coltura microbiologica in relazione alla rapidità di risultati e in scenari in cui i test tradizionali non sono fattibili.

Ente del Terzo Settore

## *Clostridium botulinum*

Causa rara di intossicazione alimentare. Si distinguono differenti forme di botulismo: I) botulismo di origine alimentare conseguente all'ingestione di tossina preformata presente nell'alimento; II) botulismo da ferita conseguente alla produzione di tossina in vivo, dopo moltiplicazione del clostridio in una ferita infetta; III) botulismo infantile, conseguente alla moltiplicazione del clostridio in vivo con produzione di neurotossina nell'intestino del bambino. Sebbene sia da considerare, a tutti gli effetti, una tossinfezione alimentare, la sintomatologia enterica può essere modesta ed incostante, prevalendo la sintomatologia neurologica.

## *Staphylococcus aureus*

È la principale causa di intossicazione alimentare, con nausea, vomito, crampi e dolori addominali, spesso seguiti da diarrea. Il periodo d'incubazione è di 1-6 ore. L'intossicazione alimentare consegue all'ingestione di alimenti ricchi di proteine (uova, latticini, salumi, creme, carni) in cui *S.aureus* si è sviluppato e ha prodotto l'enterotossina (enterotossina preformata) termostabile. Una grande varietà di cibi può essere contaminata da *S.aureus*: quelli che comunemente causano questa tossinfezione sono dolci con crema, budini, prodotti a base di latte, carni e panini ripieni. La sintomatologia è dovuta all'effetto dell'enterotossina sulla peristalsi intestinale e sul centro del vomito. La tossina è relativamente stabile e può essere presente in assenza di microrganismi vitali, dopo la cottura, pastorizzazione o conservazione prolungata di alimenti. Vi sono 21 enterotossine note di *S.aureus* ma quella più frequentemente associata ad intossicazione è l'enterotossina A. Caratteristica dell'intossicazione è la rapida comparsa dei sintomi:

malessere generale, nausea, vomito, crampi allo stomaco, e diarrea che possono manifestarsi già 30 minuti dopo l'ingestione dei cibi contaminati, anche se mediamente passano 2-7 ore. I sintomi scompaiono entro 12 ore. I soggetti non sono febbrili. La diagnosi è suggerita dall'anamnesi, dal breve periodo d'incubazione e dimostrando grandi quantità di stafilococchi nei cibi contaminati. *S. aureus* fa parte della flora intestinale e può essere presente nelle feci in scarsa concentrazione.

## *Bacillus cereus*

*B. cereus* sono batteri sporigeni, Gram-positivi, aerobi o anaerobi facoltativi. *B. cereus sensus stricto* appartiene a un gruppo più ampio di batteri comunemente denominato *Bacillus cereus group*. Il gruppo è costituito da otto specie (*B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto*, *B. cytotoxicus* e *B. toyonensis*), a cui sono state aggiunte recentemente altre specie, tutte isolate da sedimenti marini.

Nella forma sporigena, *B.cereus* è ubiquitario nell'ambiente: diffuso nel suolo, nelle matrici organiche in decomposizione, nell'acqua dolce e salata, sui vegetali e nel tratto intestinale di mammiferi e invertebrati. Dall'ambiente, le spore possono essere trasferite in varie materie prime utilizzate nell'industria alimentare. L'ospite è contaminato da spore presenti nel cibo ingerito o nell'aria inalata. Le spore sono resistenti al calore, al congelamento, all'essiccamento, possono resistere alla pasteurizzazione e ad una vasta gamma di radiazioni. La germinazione e la moltiplicazione dei batteri può essere conseguente alla bollitura o alla conservazione prolungata di alimenti (riso) a temperatura ambiente. In Europa, quale agente eziologico confermato o sospetto, è la seconda causa di outbreak di origine alimentare (FBO) dopo lo *Staphylococcus aureus*. L'impatto di *B. cereus* in FBO è tuttavia molto probabilmente sottovalutato a causa della mancanza di sorveglianza sistematica e di misidentificazione diagnostica.

Esistono due tipi di intossicazione alimentare da *B. cereus*, noti come sindrome emetica e sindrome diarroica. Quest'ultima, simile all'intossicazione da *C.perfringens*, è associata alla produzione di enterotossine nell'intestino tenue in seguito all'ingestione di alimenti contaminati. I batteri possono essere ingeriti come cellule vegetative o come spore, che una volta nell'intestino germinano, si moltiplicano e producono enterotossine. I sintomi compaiono da 5 a 24 ore dopo l'ingestione e si manifestano attraverso dolore addominale e diarrea abbondante. Le manifestazioni sono generalmente lievi con remissione spontanea entro 24 ore senza alcun trattamento. Sono stati segnalati tuttavia rari casi fatali (enterite necrotica). La sindrome emetica deriva da un'intossicazione provocata dalla tossina emetica cereulide, tossina spesso preformata nel cibo prima dell'ingestione, in grado di provocare nausea e vomito, tra 30 minuti e 6 ore dopo l'ingestione. Nella forma emetica i sintomi sono simili a quelli provocati da enterotossina di *S.aureus* e generalmente regrediscono dopo 6-24 ore. Sono documentati rari casi mortali da deficit epatico fulminante.

L'intossicazione alimentare consegue all'ingestione dell'enterotossina preformata (cereulide), presente negli alimenti contaminati (cereali, specialmente riso, latticini, carne, vegetali, alimenti essiccati). La tossina emetica (cereulide) è un peptide di origine plasmidica, resistente al calore e alla proteolisi e non viene distrutta dagli acidi gastrici e dagli enzimi proteolitici intestinali. La tossina è sintetizzata da un enzima cereulide sintetasi non ribosomiale codificato dal gene *ces*. L'efficienza della produzione di cereulide varia tra ceppi emetici con la distinzione di produttori nulli/bassi, medi e

alti. Tuttavia, i ceppi portatori del gene *ces* rappresentano una minoranza, generalmente l'1% o meno, degli isolati dal cibo o dall'ambiente.

La forma diarroica è caratterizzata da crampi addominali, dolore e diarrea acquosa, che compaiono 8-16 ore dopo l'ingestione dell'alimento che contiene spore o forme vegetative di *B.cereus*. I sintomi si risolvono in 12-24 ore. Nel piccolo intestino vengono espresse 3 tipi di enterotossine, in grado di danneggiare le membrane delle cellule epiteliali ileali: emolisina BL (Hbl), enterotossina non emolitica (Nhe) e citotossina K (CytK1-2). Nhe è riconosciuta come la principale tossina diarroica di *B. cereus*. La diarrea è di tipo secretorio e non infiammatorio. *B. cereus* fa parte della normale flora fecale e pertanto il suo isolamento dalle feci non è correlabile ad un'infezione del tratto gastrointestinale. *B.cereus* è stato isolato dalle feci di bambini e adulti sani, probabilmente in seguito ad una colonizzazione transitoria legata a bassi livelli di esposizione ambientale.

La diagnosi di tossinfezione da *B.cereus* può essere confermata però, dalla presenza di una carica superiore a $10^5$ batteri per grammo di cibo sospetto. Nel caso di episodi epidemici, come nel caso di tossinfezioni alimentari, è opportuno confermare la diagnosi con prove di sierotipizzazione che possono essere eseguite in Laboratori di riferimento.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

# EZIOLOGIA - SCHEDE TECNICHE

# BATTERI ASSOCIATI A DIARREE NOSOCOMIALI

## *Clostridium (Clostridioides) difficile*.

***Clostridium*** (microrganismo riclassificato come ***Clostridioides*** sulla base di analisi fenotipiche, chemiotassonomiche e filogenetiche) ***difficile*** è la principale causa di infezioni associate all'assistenza sanitaria, con un impatto economico considerevole in tutto il mondo. Tuttavia, la crescente scoperta di portatori asintomatici e di infezioni in ambito comunitario ha portato a considerare ulteriori fonti di trasmissione oro-fecale, come cibo, compost, letame, fonti zoonotiche, e altre esposizioni ambientali. Presente in modica quantità nella flora intestinale di adulti e più abbondantemente in quella di bambini, *C.difficile* è il più comune agente eziologico di diarrea associata ad antibiotici (AAD), colite (AAC) e di colite pseudomembranosa (AAPMC), associate all'uso di antibiotici. I cambiamenti della flora intestinale associati all'utilizzo di antibiotici possono favorire la colonizzazione da *C.difficile*. La percentuale di colonizzazione da *C.difficile* nei pazienti ospedalizzati può raggiungere il 20%. Il microrganismo, nella forma sporigena, può essere isolato dall'ambiente ospedaliero (pavimenti, servizi igienici, ecc.). Si ritiene che gli antibiotici (clindamicina, cefalosporine di terza e quarta generazione, fluorochinoloni, tetraciclina, metronidazolo o combinazioni di antibiotici), attraverso una deplezione della flora commensale intestinale, favoriscano la colonizzazione e replicazione di *C.difficile* in grado di sintetizzare le sue tossine. Fattori predisponenti, oltre la terapia antibiotica, sono l'età (>65 anni), la chirurgia addominale, malattia infiammatoria intestinale, immunosoppressione, ricoveri prolungati o multipli, ricovero in unità di terapia intensiva, oncoematologia e geriatria, residenza in una struttura di assistenza a lungo termine, l'uso di antiacidi. L'infezione può essere di origine endogena (circa il 4% di soggetti adulti alberga questo clostridio nel colon) o esogena, per la presenza di spore nell'ambiente.

Negli ultimi decenni, l'incidenza e la morbilità di infezioni da *C.difficile* (CDI) sono aumentate significativamente a livello ospedaliero, in particolare negli Stati Uniti dove rappresenta dal 15% al 25% dei casi di diarrea associati all'assistenza sanitaria. Tra le ragioni dell'aumento, multifattoriali, vengono contemplate l'invecchiamento della popolazione, l'emergere di ribotipi ipervirulenti e i miglioramenti delle indagini diagnostiche. Molti paesi hanno istituito protocolli e linee guida per ridurne l'incidenza nell'ambito delle cure acute attraverso la gestione degli antibiotici, la gestione delle epidemie, il rilevamento dei casi e adeguate precauzioni di contatto, dispositivi di protezione individuale, e pulizia ambientale.

Il quadro clinico è legato alla produzione di tossine, l'enterotossina A e la citotossina B, entrambe dotate di attività citotossica, per effetto delle quali si ha una distruzione del citoscheletro di enterociti, liberazione di citochine con attivazione di neutrofili e macrofagi, e apoptosi cellulare. La tossina B ha attività citotossica più potente di tossina A (circa 1000 volte superiore), degrada le cellule epiteliali e si ritiene che attraversi la mucosa intestinale danneggiata, esplicando effetti a distanza. Sebbene alcuni stipiti producano solo la tossina B, la maggior parte dei ceppi di *C. difficile* produce entrambe le tossine A e B. Non è stata ancora segnalata alcuna CDI dovuta a ceppi che producono la sola tossina A. Alcuni ceppi di *C. difficile* producono inoltre una terza tossina (tossina binaria, CDT). Nonostante alcuni studi abbiano riportato che la produzione di CDT, in aggiunta a TcdA e TcdB, possa essere associata a forme più gravi di malattia e ad un

rischio più elevato di recidiva, la presenza e il significato della tossina binaria rimangono tuttora incerti.

In seguito alla reazione infiammatoria e alla necrosi cellulare si ha un accumulo di liquidi e proteine nel lume intestinale, senza invasione dell'epitelio. La colite è la forma più comune, che può evolvere, in alcuni casi, nella forma più grave di colite pseudomembranosa. La sintomatologia varia da una forma benigna autolimitante di diarrea acquosa ad una forma più grave di colite con pseudomembrane, con febbre elevata, diarrea profusa con sangue, muco e leucociti nelle feci. Rare ma gravi le complicanze quali megacolon tossico, perforazione intestinale, colite fulminante (0,1-3%) con mortalità elevata. La mortalità complessiva dell'infezione da C. difficile varia dal 2 al 6%, sebbene sia significativamente più alta nei pazienti con malattia infiammatoria intestinale e in quelli ricoverati in unità di terapia intensiva. Le condizioni più comuni associate a CDI sono la disidratazione e il disordine elettrolitico che può interessare più del 90% dei pazienti. Condizioni meno frequenti associate a CDI includono setticemia, ipoalbuminemia, insufficienza renale, shock settico, ascite e peritonite. Le forme ricorrenti sono attribuibili ad una ripresa (spore non eliminate che germinano al termine dalla terapia antimicrobica) o ad una reinfezione con un nuovo stipite. I fattori di rischio per la CDI ricorrente, oltre l'uso di antibiotici e l'età avanzata, includono malattie cardiache, colonizzazione da Staphylococcus aureus resistente alla meticillina (MRSA), tromboembolia venosa (TEV), uso prolungato di inibitori della pompa protonica (PPI), degenze prolungate, CDI associata alla comunità. Il rischio di reinfezione era più frequentemente associato a un ricovero ospedaliero ad intervalli e la persistente interruzione della diversità del microbiota. Convenzionalmente, la CDI è considerata un'infezione acquisita in ospedale. Tuttavia, l'identificazione di CDI sintomatica tra individui giovani, sani e residenti in comunità ha suggerito una nuova CDI associata alla comunità (CA-CDI).

È nota da tempo la condizione di portatore asintomatico di ceppi tossinogenici specie tra i neonati (oltre 50%, fino al compimento del primo anno di età) e tra i ricoverati (20%-40%). Il portatore asintomatico di C. difficile è tuttavia presente in circa il 4-15% degli ospiti normali e può essere ancora più comune tra i pazienti adulti più anziani nelle strutture infermieristiche residenziali.

L'infezione da *C.difficile*, tipicamente di origine nosocomiale, si manifesta con discreta frequenza anche con carattere epidemico; il quadro clinico è caratterizzato da diarrea per lo più di moderata entità che spesso regredisce con la sospensione del trattamento antibiotico in corso e risponde alla terapia specifica, anche se non sono infrequenti le recidive. Nei casi gravi si associano febbre, dolore addominale, ipoalbuminemia, presenza di pseudomembrane visualizzate endoscopicamente. La progressione da CDI grave a fulminante, chiamata anche CDI "grave e complicata", include lo sviluppo di shock, ileo e/o megacolon. I casi gravi (CPM) e le complicanze (megacolon tossico) sono piuttosto rari e l'infezione costituisce un problema più per gli aspetti organizzativi e assistenziali che non per la gravità dei casi.

Lo scenario epidemiologico relativo a CDI, a partire dai primi anni 2000, cambia in maniera significativa. Dal 2001 al 2003 in alcuni ospedali del Canada si registra un improvviso aumento dell'incidenza dell'infezione specie tra i pazienti ultrasessantenni con notevole frequenza di casi gravi e aumento della mortalità attribuibile di oltre tre volte. Il fenomeno è, almeno in parte, da attribuire alla circolazione di un ceppo ipervirulento identificato in base alla tecnica di tipizzazione utilizzata con la sigla NAP1 (PFGE) o 027 (ribotiping), appartenente al tossinotipo III. Il ceppo iperproduce entrambe le

tossine a causa di una mutazione (delezione) del gene regolatore *tdc*C e possiede, analogamente ad altre specie di Clostridi, una tossina binaria, il cui significato, come sottolineato precedentemente, rimane incerto. È inoltre resistente ai nuovi fluorochinoloni attivi sugli anaerobi (moxifloxacina, gatifloxacina). Dal Canada il ceppo si diffonde negli USA (8 estese epidemie in ospedali di 6 stati) e in numerosi paesi europei in cui si registrano sia infezioni a carattere epidemico (Inghilterra, Galles, Scozia, Irlanda, Belgio, Francia, Germania, Olanda, Svizzera, Danimarca) che casi sporadici (Austria, Polonia, Spagna e di recente anche in Italia), mentre è segnalata in letteratura anche la circolazione di nuovi ceppo-tipi ipervirulenti (078). Se le manifestazioni cliniche dell'infezione sono cambiate (frequenti le complicanze gravi quali CPM, megacolon tossico e perforazione intestinale che richiedono interventi di colectomia e ricovero in UTI) ai fattori di rischio tradizionali si aggiungono l'uso dei nuovi fluorochinoloni e forse degli inibitori della pompa protonica. La popolazione di ribotipi di C. difficile, pur essendo molto ampia, è dominata da pochi: BI/NAP1/027, 014, 001/072 e 078 sono prevalenti in ambito europeo. Alcuni ribotipi sono associati a popolazioni specifiche, come RT 078 e pazienti più giovani con CA-CDI. Altri hanno specificità regionali (RT 018 prevalentemente in Italia, Giappone e Corea). Quasi tutti i ceppi di ribotipi, come BI/NAP1/027, 001 e 106 sono resistenti all'eritromicina, molti sono resistenti ai fluorochinoloni e alcuni ceppi di BI/NAP1/027 e 001 sono resistenti anche alla clindamicina. RT BI/NAP1/027, 017 e 198 possono avere resistenza a cinque o più antibiotici. Recentemente, alcuni studi hanno evidenziato un aumento di ceppi di *C. difficile* produttori della tossina binaria, nonostante la mancanza del gene cdtA (A-B+ CDT+), così come la presenza di alcuni ceppi (circa il 2%) produttori della tossina binaria in assenza di geni cdtA e cdtB, la cui rilevanza clinica rimane dubbia.

Il riscontro in ambito veterinario di ceppi ipervirulenti nel bestiame (bovini, suini) e negli animali di affezione (cani, gatti) potrebbe indicare la presenza di un *reservoir* che alimenta i sempre più frequenti casi di origine comunitaria. Una delle connotazioni più recenti del quadro epidemiologico è data dall'aumento dell'incidenza di casi di origine comunitaria che si manifestano, a volte con carattere di notevole gravità anche in soggetti privi dei noti fattori di rischio per l'infezione, compresi bambini, adulti giovani e donne in gravidanza.

Per la diagnosi di CDI sono contemplati diversi metodi, tra cui la coltura tossinogenica (TC), il test di neutralizzazione della citotossicità cellulare (CCNA), i saggi immunoenzimatici (EIA) ed immunocromatografici per la rilevazione delle tossine A, B e/o di glutammato deidrogenasi (GDH) e i test di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT). Sebbene manchi un "gold standard" di riferimento definitivo, sia il TC che il CCNA sono considerati metodi di riferimento accettabili che, per la loro complessità, sono generalmente riservati ai laboratori di riferimento. I test possono essere classificati in due gruppi: (1) quelli che rilevano l'organismo stesso (o un componente dell'organismo), come la coltura batterica anaerobica, glutammato deidrogenasi (GDH) e test dell'acido nucleico che rilevano i geni che codificano le tossine A e B; e i test che rilevano la tossina libera, come i test di neutralizzazione della citotossicità delle colture cellulari (CCCNA) e i test immunoenzimatici (EIA). La diagnosi di CDI richiede che la combinazione di test di laboratorio sia in grado di differenziare CDI da casi diarroici non CDI, inclusa la diarrea non CDI in un paziente colonizzato da *C. difficile.* La diagnosi, salvo i casi di CPM in cui è endoscopica, si basa generalmente sulla ricerca nelle feci dell'antigene comune, delle tossine A/B per lo più con metodi immunometrici del commercio (EIA, IC), dei geni che codificano per le tossine mediante metodi molecolari.

**Definizioni** In quanto la diarrea non costituisce più la manifestazione esclusiva, è oggi infatti più appropriato parlare di malattia (*C.difficile associated disease*: CDAD) o di infezione da *C.difficile* (ICD). Il riscontro poi di infezioni di origine comunitaria ha indotto a modificare in senso estensivo le tradizionali definizioni della malattia. Le Società di Malattie Infettive e la Società di Epidemiologia Sanitaria Americane (*Infectious Diseases Society of America - Society for Healthcare Epidemiology of America*) (IDSA/SHEA) definiscono

**Caso di ICD (CDAD)**: paziente con diarrea (tre o più scariche di feci non formate in 24 ore) in presenza di un test di laboratorio positivo per la presenza di tossina A/B e un risultato positivo a uno o entrambi i seguenti test: amplificazione dell'acido nucleico test (NAAT) e test del glutammato deidrogenasi (GDH).

**Caso di ICD/CDAD ricorrente**: nuovo episodio che si verifica dopo non oltre 8 settimane da un episodio precedente, a condizione che quest'ultimo si sia clinicamente risolto.

**Caso grave di ICD/CDAD**: comparsa di uno o più degli eventi sottoelencati entro 30 giorni dall'insorgenza:

- ricovero in UTI per complicanze (es., shock)
- colectomia per megacolon tossico, perforazione ecc.
- decesso

***Health Care Facility associated/HCF onset*** (ICD/CDAD di origine nosocomiale insorta in ospedale) insorta dopo più di 48 ore dal ricovero

***Health Care Facility associated/Community onset*** (ICD/CDAD di origine nosocomiale insorta in comunità) insorta in comunità o entro 48 ore dal ricovero in paziente dimesso da un ospedale da non più di 4 settimane

***Community associated*** (ICD/CDAD di origine comunitaria) insorta in comunità o entro 48 ore dal ricovero in paziente eventualmente dimesso da un ospedale da oltre 12 settimane

# EZIOLOGIA - SCHEDE TECNICHE

# PATOGENI EMERGENTI

Vi sono altri batteri che sono stati associati a gastroenteriti ma vi sono limitate informazioni che possano comprovare un loro reale coinvolgimento.

## *Arcobacter buzleri*

Negli ultimi anni il genere *Arcobacter* ha assunto maggiore rilevanza perché i suoi membri sono stati considerati enteropatogeni emergenti e potenziali agenti zoonotici. Sulla base delle caratteristiche fenotipiche simili, essi sono stati inizialmente classificati come *Campylobacter* spp. aerotolleranti, fino a quando è stato introdotto un genere indipendente nel 1991. Da allora, sono state identificate 18 specie e sono in attesa di essere definite nuove specie. Le specie *A.butzleri*, *A.cryaerophilus*, *A.skirrowii*, *A.cibarius*, *A.thereius*, e *A.trophiarum* sono state identificate nel bestiame in tutto il mondo e sono state isolate da alimenti di origine animale. Alcune specie di *Arcobacter* sono state isolate da feci di pazienti con o senza diarrea e, occasionalmente, in associazione con batteriemia, endocardite e peritonite. Gli *Arcobacter* sono stati classificati come patogeni emergenti *dalla International Commission on Microbial Specifications for Foods*. Attualmente, 3 specie sono state segnalate in grado di infettare gli esseri umani. L'assunzione di acqua contaminata o di cibi crudi o poco cotti sono le fonti più frequenti di infezione umana. Un'associazione di *A.butzleri* e *A.cryaerophilus* con enterite, colite e setticemie è stato proposto in studi epidemiologici, report epidemiologici, e *case report*, anche se *A.cryaerophilus* può anche essere presente in soggetti sani. Più recentemente, *A.skirrowii* è stato implicato come agente causale di batteriemia e colite in *case report* individuali. Nonostante ciò, l'incidenza di *Arcobacter* species è probabilmente sottostimata, soprattutto a causa di limitazioni di metodi correnti di rilevamento e identificazione. La maggior parte dei laboratori non usano metodi adeguati o condizioni di coltura per individuare specie diverse da *Campylobacter jejuni* e *C.coli* da feci. Inoltre, l'identificazione di *Campylobacter* e organismi simili a livello di specie non viene sempre eseguita o viene eseguita con metodi fenotipici, portando a risultati contrastanti. Quindi, i dati sull'incidenza e la rilevanza clinica di *Arcobacter* rimangono scarse. Sebbene il ruolo di *Arcobacter* specie in malattie umane non sia ancora ben definito, *A.butzleri* e *A.cryaerophilus* sono stati associati a malattie gastrointestinali in diverse occasioni, sia in studi di popolazione e in casi clinici. Una persistente diarrea acquosa è il sintomo principale associato con *A.butzleriA.* Sebbene *Arcobacter* spp. non siano attualmente considerati i microrganismi di grande preoccupazione per la salute pubblica, i dati suggeriscono sempre di più che il loro significato nelle infezioni umane possa essere sottovalutato, soprattutto a causa di metodi inadeguati per la rilevazione e identificazione

## *Bacteroides fragilis*

Stipiti di *B.fragilis* possono trasportare isole di patogenicità che producono un'enterotossina (zinco-metalloproteasi). Tali stipiti (ETBF) sono stati implicati non solo in malattie diarroiche in bambini sotto i 5 anni, ma anche associati recentemente a diarrea infiammatoria in bambini e in adulti. Attualmente non è semplice rilevare stipiti ETBF nei campioni fecali. Il microrganismo può essere isolato su Bile-esculina agar e quindi valutato per la sua enterotossigenicità mediante sistema molecolare

## *Edwardsiella tarda.*

*E.tarda* è una delle 4 specie che risiedono nel genere *Edwardsiella* ed è la sola specie ritenuta potenzialmente patogena per l'uomo. È un ospite comune di pesci, rettili, animali e uccelli marini e può essere isolata anche dall'acqua. La maggior parte delle patologie attribuite a *E.tarda* implicano un interessamento del tratto gastrointestinale, con varie forme diarroiche di cui la più frequente è una diarrea acquosa. Fattori di rischio sono rappresentati dall'assunzione di pesci o frutti di mare contaminati, l'esposizione ad acque di acquari, la manipolazione di tartarughe domestiche.

## *Escherichia albertii*

*E.albertii* è una nuova specie nel genere *Escherichia* descritta per la prima volta nel 2003. la maggior parte degli stipiti, precedentemente misidentificati come *Hafia alvei*, vennero isolati da campioni di feci in bambini del Bangladesh con malattia diarroica. Il microrganismo, che può presentare fattori di enteropatogenicità, cresce sui normali terreni di coltura per patogeni enterici e viene spesso misidentificato con *Hafnia, Citrobacter, E.coli* inattivi. Le principali differenze fenotipiche con *E.coli* sono rappresentate dall'indolo-negatività e l'incapacità di fermentare lattosio, sorbitolo e xylosio. Studi filogenetici avrebbero inoltre dimostrato che *Shigella boydii* tipo 13 sia di fatto identificabile con *E.albertii.* Questo microrganismo può essere identificato mediante sequenziamento del gene 16S rRNA o mediante MALDI-TOF MS.

## *Klebsiella oxytoca*

Nel 2006 una serie di osservazioni e di studi istopatologici su 6 pazienti con colite emorragica associata ad antibiotici (AAHC) avrebbero stabilito il ruolo di *K.oxytoca* quale agente eziologico di colite emorragica *C.difficile* negativa. Attualmente la conferma di colite da *K.oxytoca C.difficile* negativa necessita di conferma mediante rilevamento di citotossina specie-specifica su cellule HeLa.

## *Providencia alcalifaciens*

Alcune osservazioni metterebbero in correlazione questo microrganismo con malattie diarroiche.

# EZIOLOGIA - SCHEDE TECNICHE

# ENTERITI VIRALI

Si può ritenere che sino al 1970, un'eziologia virale in casi di enteropatie acute fosse stata raramente posta in discussione. Da allora, è stato scoperto un sempre più ragguardevole numero di virus ritenuti responsabili di enteropatie acute: tali i Rotavirus, gli Adenovirus fecali, il virus Norwalk e i virus Norwalk-like, i Calicivirus, gli Astrovirus, i Coronavirus e, sia pure con dovute riserve, gli Enterovirus. Gran parte di questi virus risultano poter essere associati a forme sporadiche, endemiche ed epidemiche di gastroenterite, specialmente in bambini, e, in misura non trascurabile, ad enteropatie nosocomiali.

Le gastroenteriti virali sono caratterizzate abitualmente da un periodo di incubazione oscillante tra le 18 e le 72 ore, con comparsa di diarrea acquosa non ematica, accompagnata generalmente da vomito, da crampi addominali, nausea e febbre di solito di moderata entità. Circa il 30% delle infezioni rimane asintomatica, mentre il 10-12% richiede l'intervento medico e in alcuni casi l'ospedalizzazione. Le forme più gravi interessano i neonati e i pazienti anziani, in particolare quelli con malattie croniche debilitanti.

I virus attualmente sono ritenuti responsabili di circa i 3/4 di tutte le diarree infettive e le gastroenteriti virali rappresentano la seconda più comune malattia virale dopo le infezioni delle basse vie respiratorie. Nei Paesi in via di sviluppo sono la principale causa di mortalità in età infantile, nelle popolazioni denutrite: si stima che annualmente i Rotavirus provochino circa 450.000 morti e gli Adenovirus 200.000.

## *Rotavirus*

Descritto per la prima volta nel 1973 da Bishop, mediante microscopia elettronica da campioni di biopsia duodenale, Rotavirus (virus a RNA a doppia catena) è considerato attualmente l'agente etiologico più importante di diarrea infantile sia nei Paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo (25-60% di diarree infantili severe nel mondo): è la causa più comune di gastroenteriti virali fra i neonati e i bambini al di sotto dei 5 anni. In particolare, nei bambini molto piccoli (tra i 6 e i 24 mesi) il virus può causare una diarrea severa e disidratazione. Vengono segnalati circa 150 milioni di episodi all'anno con 430.000 morti. Indagini sieroepidemiologiche hanno confermato che la maggior parte delle infezioni da Rotavirus si manifesta nei bambini di età inferiore ai 5 anni, e che la maggioranza degli individui diventerebbe siero positivo prima dei 5 anni.

Diffusa in tutto il mondo, la gastroenterite da Rotavirus è generalmente a carattere endemico, anche se può essere responsabile di forme epidemiche (segnalate epidemie da Rotavirus in asili nido). Rotavirus è anche responsabile di forme nosocomiali.

In Europa e nelle zone temperate il virus si presenta con picchi di incidenza stagionale (novembre e marzo), mentre nei Paesi tropicali il virus è presente sostanzialmente tutto l'anno. In Italia, è confermato che Rotavirus è il principale agente di diarrea in età pediatrica, di più frequente reperto nei primi mesi di vita, talora superiore a quello di batteri patogeni e responsabile del maggior numero di ricoveri di lattanti. Nei Paesi occidentali, la gastroenterite da Rotavirus può dare complicanze anche molto gravi nelle persone anziane e in quelle immunocompromesse. Nei Paesi del Sud del mondo, al contrario, causa la morte di almeno 600 mila bambini ogni anno per diarrea, secondo le stime dell'Organizzazione mondiale della sanità che considera la malattia una vera e propria emergenza sanitaria. Nei bambini immunocompromessi o malnutriti, le forme

gastroenteriche possono essere gravi, prolungate e anche mortali. Nell'adulto forme gravi di gastroenterite possono manifestarsi nell'anziano e nei soggetti immunodepressi.

Appartenente alla famiglia delle Reoviridiae, può infettare altri mammiferi e uccelli, causando diarrea. Si riconoscono 7 differenti gruppi di Rotavirus (A-G): gruppo A, con i sottotipi 1,2,3,4, che rappresenta i principali patogeni umani, potendo però infettare altri mammiferi (scimmie, vitelli, topi); gruppo B che infetta maiali, ratti ma anche l'uomo (epidemia in Cina); gruppo C che infetta maiali e occasionalmente l'uomo; gruppo D che infetta uccelli e il gruppo E che infetta maiali. L'infezione è più intensa quando provocata dai Rotavirus A (e in misura minore da quelli B e C). L'immunità imperfetta comporta la possibilità di infezioni successive, solitamente causate da un genotipo diverso, per tutta la vita; tuttavia, la maggior parte della morbilità e mortalità dovute all'infezione da RV si verifica nei bambini di età inferiore ai 5 anni.

La via di penetrazione dei Rotavirus nell'organismo umano è orofecale e, tenuto conto che il pH del succo gastrico del bambino è di circa 3.2, si comprende come, in un certo numero di casi, essi possano superare la barriera gastrica. Determinando frequentemente anche vomito, questo materiale è ritenuto potenziale veicolo di trasmissione (aerosol). Poiché il virus è stabile nell'ambiente, la trasmissione può avvenire attraverso l'ingestione di acqua o cibo contaminato o, più di frequente, specie in ambito nosocomiale, a causa del contatto con superfici contaminate. La diffusione da persona a persona attraverso la contaminazione delle mani è probabilmente la più diffusa negli ambienti comunitari, in particolare negli asili nido. Qualche volta la diffusione può avvenire anche per via respiratoria.

La malattia ha un periodo di incubazione di circa due giorni, dopo i quali insorgono febbre, disturbi gastrici, vomito e diarrea acquosa per 3-8 giorni. Nella maggior parte dei casi, quando si sviluppa una forma blanda di diarrea, i malati guariscono senza alcun trattamento. Tuttavia, una diarrea acuta può portare a disidratazione grave dell'organismo. Forme severe e prolungate di malattia possono manifestarsi in presenza di malnutrizione, deficit immunitari, malattie debilitanti con possibili localizzazioni extra-intestinali. L'introduzione della vaccinazione della prima infanzia ha portato nei Paesi ad alto reddito, a riduzioni significative dell'incidenza di infezione da Rotavirus.

La diagnosi viene effettuata ricercando antigeni specifici di rotavirus su campioni fecali. Il ceppo coinvolto può essere ulteriormente caratterizzato tramite saggi immunoenzimatici o molecolari, ma si tratta di analisi che non vengono effettuate comunemente. Sebbene i test basati su qPCR siano i più sensibili, al di fuori dei pannelli di patogeni multiplex, normalmente non sono disponibili in commercio.

## *Adenovirus*

Appartenenti alla famiglia Adenoviridiae, virus a DNA lineare a doppio filamento, gli Adenovirus enterici rappresentano la seconda causa, dopo i Rotavirus, di gastroenteriti infantili ad etiologia virale. I progressi nelle tecniche diagnostiche suggeriscono che la vera prevalenza di adenovirus enterici tra i bambini sia sensibilmente superiore a quanto precedentemente ritenuto. Si conoscono almeno 100 sierotipi di adenovirus, e oltre la metà possono potenzialmente infettare l'uomo e sono suddivisi in sei specie. Gli adenovirus sono insolitamente resistenti a cambiamenti chimici o fisici dell'ambiente nel quale si trovano, il che ne rende possibile la sopravvivenza anche per lunghi periodi al di fuori dei fluidi corporei. Il contagio avviene principalmente attraverso la saliva. La maggior parte dei pazienti viene infettata da Adenovirus diffusi per aerosol, per via oro fecale e per contatto degli occhi con mani infette. Questi agenti infettanti, specie i sierotipi

2, 3, 5, 40 e 41, sono piuttosto resistenti al pH acido, pertanto sono in grado di raggiungere facilmente l'intestino e moltiplicarsi, creando danno. Gli Adenovirus vengono successivamente eliminati dall'ospite tramite le feci. Isolati in tutto il corso dell'anno, con una certa predilezione per i mesi caldi, la loro massima incidenza ha luogo verso i due anni o in bambini ancora più piccoli. Le infezioni hanno tendenza endemica, anche se sono state riportate epidemie in reparti di pediatria e in asili nido. Adenovirus enterici possono causare manifestazioni extraintestinali, in particolare nella popolazione immunocompromessa. Il periodo di incubazione sarebbe compreso tra 3-10 giorni, il sintomo principale della gastroenterite è la diarrea, accompagnata o meno da vomito e dolori addominali. In ogni caso, la sintomatologia morbosa risulterebbe più blanda rispetto a quella sostenuta da Rotavirus. Gli Adenovirus di gruppo F (40 e 41) sono la causa più frequente di malattia diarroica.

### *Norovirus (Calicivirus)*

Il virus di Norwalk, membro della famiglia delle *Caliciviridae* (virus a RNA a catena singola), scoperto in questa località (Ohio) nel 1968, è stato ritenuto per lungo tempo in grado di provocare manifestazioni enteriche solo in bambini di età più avanzata e in adulti. In epoca più recente, peraltro, non sono mancati riscontri di diarrea e vomito correlabili al virus Norwalk, nonché reperti di anticorpi specifici in soggetti di età infantile. I Norovirus sono tra le principali cause di gastroeneteriti epidemiche nel mondo, sono altamente contagiosi e si diffondono rapidamente. Questi virus colpiscono circa 267 milioni di persone all'anno con più di 200,000 morti. In EU, nel 2021 norovirus è stato identificato come la terza causa di focolai epidemici di origine alimentare causando 251 focolai e oltre 6.500 casi di infezione. La malattia grave è più comune agli estremi dell'età, con i bambini piccoli a maggior rischio di necessitare di cure mediche e gli adulti di età superiore ai 65 anni a maggior rischio di morte correlata. I genogruppi I e II raccolgono circa il 99% delle infezioni umane. Il genotipo GII.4 risulterebbe più frequentemente associato a focolai di epidemici. Negli Stati Uniti è la causa più comune di gastroenterite, provocando milioni d'infezioni annualmente, in tutti i gruppi d'età. Gli episodi epidemici hanno luogo soprattutto nelle scuole, negli asili nido, in orfanotrofi, in strutture assistenziali, in degenti di reparti ospedalieri, in gruppi famigliari, in ristoranti e navi da crociera. Norovirus hanno una bassa dose infettante, possono sopravvivere a varie temperature e a disinfettanti. La trasmissione avviene da persona a persona attraverso la via oro-fecale, in seguito all'assunzione di acque o cibi contaminati o al contatto con fomiti contaminati. Il contagio può avvenire anche mediante la nebulizzazione e diffusione delle gocce di flug salivare dell'infetto, nell'aria, su superfici e sugli alimenti. Sul piano clinico-diagnostico, i sintomi delle infezioni da Calicivirus sono di una severità paragonabile a quella espressa negli episodi sostenuti da Rotavirus con diarrea, per lo più acquosa, e vomito parimenti associati, a volta prevalenti l'una sull'altro come frequenza, intensità, durata. Possono anche essere presenti mialgia e crampi addominali. Il periodo di incubazione è di 12-72 ore; la durata dei sintomi varia da 24 a 72 ore; il virus viene escreto per 5-7 giorni dopo la scomparsa dei sintomi. L'acqua municipale non adeguatamente trattata, l'acqua di piscine, fontane, di molluschi allevati alle foci dei fiumi, sono la sorgente di infezione che è stata maggiormente correlata alle epidemie sostenute da questi virus.

La diagnosi, oltre alla presenza di una fenomenologia specifica, come diarrea, vomito, dolori addominali, può essere confortata dall'assenza di leucociti nelle feci, dalla negatività delle coprocolture e dall'assenza di una anamnesi che faccia pensare ad altre etiologie, batteriche o parassitarie.

Questi virus sono evidenziabili mediante microscopia elettronica (feci e di biopsie intestinali), nonché con l'uso di colture cellulari primarie. Contemporaneamente, sempre a scopo diagnostico, sono state approntate tecniche di rapida esecuzione, a partire da saggi immunoenzimatici, radioimmunologici, di immunofluorescenza, latex-agglutinazione, emagglutinazione, emadsorbimento, sino alla ibridizzazione diretta o l'amplificazione degli acidi nucleici.

## Sapovirus

Altro calicivirus a RNA a filamento singolo che causa gastroenterite acuta sia in forma sporadica che epidemica tra individui di qualsiasi età. In contesti con risorse limitate, vi è una maggiore incidenza della malattia da sapovirus nel primo e nel secondo anno di vita. Come Norovirus, il sapovirus richiede solo un piccolo inoculo per causare l'infezione e subisce una rapida evoluzione.

## Astrovirus

Astrovirus è un altro virus a RNA a filamento singolo con più sierotipi che causano gastroenterite acuta, principalmente nei bambini, essendo solo raramente segnalato come patogeno negli adulti. L'infezione è generalmente lieve e autolimitante, ma sono state riportate infezioni gravi e/o diffuse in pazienti gravemente immunocompromessi. Gli Astrovirus sono stati riconosciuti responsabili di circa il 5% di gastroenteriti infantili, comprese le infezioni nosocomiali. Il periodo di incubazione, come in altre enteriti virali, è di 24-36 ore, con durata della sintomatologia della durata di 1-4 giorni. Nei bambini, la diarrea è acquosa, associata in un terzo dei casi a vomito e talora, a dolori addominali e febbre. I virus possono essere messi in evidenza nelle feci mediante microscopia elettronica. Recentemente si è reso disponibile un test immunocromatografico.

## Coronavirus

In indagini epidemiologiche condotte nel Regno Unito, Germania, India, Australia, la frequenza di isolamento di Coronavirus da pazienti colpiti da enterite, non superiore al 6%, è risultata sovente sovrapponibile a quella rilevata in soggetti sani, da cui il quesito sul reale ruolo etiopatogenetico di questi virus nel contesto di enteropatie diarroiche.

## Enterovirus

Il ruolo che gli Enterovirus (Poliovirus, virus Coxsackie, virus ECHO) possono assumere nella etiopatogenesi di enteropatie acute infettive ha costituito, sin dall'epoca della loro scoperta a livello intestinale, tema di ampie discussioni in merito a possibili correlazioni tra l'accertata presenza del virus nelle feci e l'eventuale manifestarsi di sindromi gastroenteriche. I virus ECHO possono essere causa di diarree acute sporadiche negli adulti e di epidemie soprattutto tra i neonati.

© AMCLI Associazione Microbiologi Clinici Italiani Ente del Terzo Settore

## EZIOLOGIA – ENTERITI PARASSITARIE

Le "parassitosi intestinali" causate da parassiti ad habitat intestinale sono diagnosticate mediante esame coproprassitologico che evidenzia trofozoiti,cisti, oocisti di protozoi, oppure adulti, uova, larve di elminti.

Recentemente il metodo microscopico è stato affiancato da test molecolari e antigenici, che svolgono un ruolo di ausilio, ma non sostituiscono in toto il metodo tradizionale.

Per maggiori dettagli si rimanda al Percorso diagnostico delle parassitosi intestinali - AMCLI

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

Ricerca di:
*Salmonella*

Campione fecale

COLTURA

B

Arricchimento

A

35°C

Terreno Selettivo

Terreno cromogenico

\+

Identificazione Biochimica/ spettrometrica

Conferma sierologica

Tipizzazione

Antibiogramma

\+

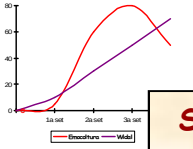
Refertazione

Multiplex PCR Pannelli sindromici (PS)

\-

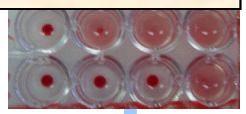
\-

Emocoltura



①

Sierodiagnosi



Refertazione

## COLTURA

**A** Semina diretta: il materiale fecale va sospeso in soluzione fisiologica (diluizione 1:10); alcune gocce di sospensione fecale vanno seminate su **terreni di coltura selettivi** (Hektoen enteric, Xylose Lysine Desoxycholate, Salmonella-Shigella agar) e/o **cromogenici** e incubate in **aerobiosi** a **35°C**.

**B** Semina con arricchimento: materiale fecale sospeso in **brodo di arricchimento** (Selenite Broth; rapporto 1:5); dopo incubazione (6h a 35°C), sottocoltura su terreni solidi selettivi e/o cromogenici.

Alcuni stipiti di *Shigella* sono inibiti nella stessa misura di *E.coli*: per l'isolamento di *Shigella* è quindi raccomandato l'uso di un brodo d'arricchimento meno selettivo (GN broth).

## Dosaggio molecolare

Sono stati sviluppati sistemi multiplex e pannelli sindromici (PS) per l'individuazione di patogeni enterici batterici, virali e parassitari. I PS, nella maggior parte dei casi, vanno ad aggiungersi, integrando e non sostituendo, le metodiche diagnostiche tradizionali che risultano ancora necessarie, per avere a disposizione gli isolati microbici su cui eseguire saggi fenotipici.

① In caso di **febbre tifoide** importante è la tempistica di campionatura: durante la prima settimana d'infezione, i microrganismi possono essere più facilmente isolati da sangue (**emocoltura**), mentre gli isolamenti da feci e urine risultano essere positivi durante la seconda e terza settimana.

Gli anticorpi nel siero (**reazione di Widal**) cominciano a comparire durante la seconda settimana di malattia, raggiungendo la punta massima durante la quarta-quinta settimana e persistendo per molte settimane dopo la remissione della malattia.

Ricerca di:
*Shigella*

Campione fecale

COLTURA

Multiplex PCR Pannelli sindromici (PS)

\+

Refertazione

B

Arricchimento

A

35°C

Terreno Selettivo-differenziale

\-

\+

\-

Identificazione Biochimica/ spettrometrica

Conferma sierologica

Tipizzazione

Antibiogramma

Refertazione

Refertazione

## COLTURA

**A** Semina diretta: il materiale fecale va sospeso in soluzione fisiologica (diluizione 1:10); alcune gocce di sospensione fecale vanno seminate su **terreni di coltura selettivi** (Hektoen enteric, Xylose Lysine Desoxycholate, Salmonella-Shigella agar) e incubate in **aerobiosi** a **35°C**.

**B** Semina con arricchimento: materiale fecale sospeso in **brodo di arricchimento** (Tetrathionate, Kauffmann Muller Tetrathionate broth ; rapporto 1:5); dopo incubazione (≤ 6ore), sottocoltura su terreni solidi selettivi.

## Dosaggio molecolare

Sono stati sviluppati sistemi multiplex e pannelli sindromici (PS) per l'individuazione di patogeni enterici batterici, virali e parassitari. I PS, nella maggior parte dei casi, vanno ad aggiungersi, integrando e non sostituendo, le metodiche diagnostiche tradizionali che risultano ancora necessarie, per avere a disposizione gli isolati microbici su cui eseguire saggi fenotipici.

Ricerca di:
*Campylobacter*

Campione fecale

COLTURA

B

Arricchimento

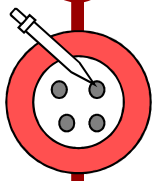
A

42°C

Microaerofilia

Terreno Selettivo
Terreno Cromogenico

C



Membrana filtrante

35°C

Microaerofilia

Terreno
Non selettivo

\+

Identificazione
Biochimica/
spettrometrica

Antibiogramma

B

C

\+

EIA - IC

\-

A

\+ \-

A

Multiplex PCR
Pannelli
sindromici (PS)

\- \+

Refertazione

## COLTURA

A Semina diretta: alcune gocce di sospensione fecale vanno seminate su **terreni di coltura selettivi** (Skirrow, Karmali, Butzler, Preston, Bolton, CCDA) e incubate in **microaerofilia** a **42°C**.

B Semina con arricchimento: materiale fecale sospeso in **brodo di arricchimento** (Campy-THIO; rapporto 1:5); dopo incubazione, sottocoltura su terreni solidi selettivi (procedure indicate quando si ipotizzano cariche microbiche vitali basse).

C Semina su membrana filtrante: 4-5 gocce di sospensione fecale vengono deposte sopra una **membrana filtrante sterile**, poggiata su una piastra di coltura con **terreno non selettivo**. Dopo un'incubazione a 37°C per 45', si procede alla rimozione del filtro e all'incubazione definitiva per **24-48 ore a 37°C** in **microaerofilia**. (tecnica indicata per l'isolamento di *Campylobacter* e di generi correlati (incapaci di crescere a 42° C o su terreni selettivi).

## Immunodosaggio (EIA)

La disponibilità di *tests* immunologici per il rilevamento di antigeni del *cell-wall* di *Campylobacter* nelle feci, implica la possibilità di strategie diagnostiche alternative.

A :utilizzo del test **EIA in parallelo al saggio colturale**, con refertazione a prescindere dal risultato colturale;

B :utilizzo del test **EIA in parallelo al saggio colturale**, con verifica, nei casi discordanti (EIA positivi, coltura negativi) mediante saggio colturale alternativo o sistema molecolare (in mancanza di queste possibilità procedere su base clinico-anamnestica).

C :utilizzo del test **EIA come screening iniziale**, seguito, in caso di positività, da una conferma colturale.

## Dosaggio molecolare

Sono stati sviluppati sistemi multiplex e pannelli sindromici (PS) per l'individuazione di patogeni enterici batterici, virali e parassitari. I PS, nella maggior parte dei casi, vanno ad aggiungersi, integrando e non sostituendo, le metodiche diagnostiche tradizionali che risultano ancora necessarie, per avere a disposizione gli isolati microbici su cui eseguire saggi fenotipici.

A :utilizzo del test in **PCR come screening iniziale**, seguito, in caso di positività, da una conferma colturale.

Ricerca di:
*E.coli* shiga-like (STEC)

A

B

Multiplex PCR
Pannelli sindromici (PS)

Arricchimento

PCR
Stx1, Stx2

Arricchimento

A

Arricchimento

COLTURA

A

35°C

SMAC
CT-SMAC

CHROM O157
CHROM STEC

EIA - IC

\+

\-

1

Sierodiagnosi

C

\+

Caratterizzazione molecolare

PCR
NGS

Identificazione Biochimica

Conferma sierologica

Antibiogramma

Refertazione

## COLTURA

(A) Essendo piuttosto problematico, l'esame colturale viene **indicato in campioni risultati positivi ad un test di screening molecolare** per la presenza dei geni *stx* codificanti per le Shiga-tossine

Semina diretta: alcune gocce di sospensione fecale vanno seminate su **terreni di coltura selettivi differenziali** e/o **cromogenici** [McConkey + sorbitolo (SMAC)] per l'isolamento di *E.coli* O157:H7; variante di McConkey + sorbitolo contenente cefixime e tellurito (CT-SMAC), per rilevare stipiti di *E.coli* O157sorbitolo-negativi; CHROMagar O157 che rileva il sierogruppo O157; CHROMagar STEC che rileva O157 e altri sei sierogruppi prevalenti (O26, O45, O103, O111, O121, O145). Generalmente è preferibile un'incubazione in **brodo di arricchimento** (16-24 ore a 37°C) piuttosto che la semina diretta.

## Immunodosaggio (EIA,IC)

(A) La ridotta sensibilità e lo scarso valore predittivo negativo degli immunodosaggi per il rilevamento di antigeni di O157 ne limitano l'impiego diagnostico. Possono fornire viceversa un valido aiuto nella diagnosi di infezione da VTEC test immunoenzimatici, immunocromatografici per la ricerca nelle feci delle shiga tossine. I brodi di arricchimento risultati positivi per Sxt dovrebbero essere inviati ad un Centro di Sanità Pubblica per l'isolamento e la caratterizzazione.

## Dosaggio molecolare

(A) Sono sati sviluppati sistemi molecolari multiplex, così come pannelli sindromici (PS) in grado di rilevare geni *Shiga*-tossinici direttamente da campioni fecali o previo arricchimento in brodo. Questi sistemi potenzialmente molto sensibili possono garantire diagnosi rapide in grado di contribuire ad un approccio clinico-terapeutico più efficace e tempestivo soprattutto in situazioni a maggior rischio di complicanze (HUS).

(B) **L'orientamento attuale è quello di ricorrere alla dimostrazione diretta della presenza nelle feci dei geni *stx1* e *stx2* codificanti le Shiga tossine mediante test molecolari basati sulla real time PCR**. Per il rilevamento di *stx1* e *stx2* è auspicabile l'utilizzo di un brodo di arricchimento, tipicamente brodo GN, inoculato e incubato a 37°C per una notte.

(C) I principali STEC sierotipi vengono identificati mediante real time PCR per i sierogruppi più frequentemente associati all'infezione umana.

① I test sierologici sono diventati uno strumento diagnostico utile e affidabile per le infezioni da STEC, soprattutto quando manca l'isolamento batterico. L'anticorpo sierico anti-STEC LPS, che può persistere per diverse settimane, ha un valore per la diagnosi.

**Ricerca di:**
***Yersinia***

COLTURA

Multiplex PCR
Pannelli
Sindromici (PS)

\+

Refertazione

\-

Refertazione

B

A

Arricchimento

20°C

Terreno
Selettivo

Terreno
cromogenico

\-

\+

Identificazione
Biochimica/
spettrometrica

Antibiogramma

Refertazione

## COLTURA

**A** Semina diretta: il materiale fecale va sospeso in soluzione fisiologica (diluizione 1:10); alcune gocce di sospensione fecale vanno seminate su **terreni di coltura selettivi** (CIN: Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar); l'uso di terreni cromogenici (CHROMAgar Yersinia) può facilitare l'identificazione presuntiva: Incubazione in **aerobiosi** a **20°C**. (raccomandate basse temperature di incubazione per l'isolamento primario)

**B** Semina con arricchimento: le procedure di arricchimento possono facilitare il rilevamento di basse cariche microbiche nelle fasi di convalescenza della malattia o in soggetti asintomatici. **Arricchimento a freddo**: materiale fecale sospeso in soluzione salina fosfata (pH 7,6) e conservato a 4° per 3 settimane con sottocolture settimanali su McConkey. **Arricchimento alcalino**: materiale fecale mescolato con KOH 0.5% (rapporto 1:2), vortexato per 2 minuti e seminato (0.1 ml) su McConkey; incubazione a 25 o 35°C per 48 ore.

## Dosaggio molecolare

Sono stati sviluppati sistemi multiplex e pannelli sindromici (PS) per l'individuazione di patogeni enterici batterici, virali e parassitari. I PS, nella maggior parte dei casi, vanno ad aggiungersi, integrando e non sostituendo, le metodiche diagnostiche tradizionali che risultano ancora necessarie, per avere a disposizione gli isolati microbici su cui eseguire saggi fenotipici.

Ricerca di: *Vibrio*

Campione fecale

Multiplex PCR
Pannelli sindromici

\+

COLTURA

\-

Refertazione

Arricchimento

B

$H_2O$ pH 8,5

A

35°C

Terreno Selettivo

\-

\+

Refertazione

Identificazione Biochimica/ spettrometrica

Conferma sierologica

Tipizzazione

Antibiogramma

Refertazione

RPLA
ELISA

IC
EIA

A

B

Refertazione

Refertazione

## COLTURA

A Semina diretta: il materiale fecale va sospeso in soluzione fisiologica (diluizione 1:10); alcune gocce di sospensione fecale vanno seminate su **terreni di coltura selettivi** [TCBS (tiosolfato- citrato-sali biliari-saccarosio) agar] e incubate in **aerobiosi** a **35°C**.

B Semina con arricchimento: materiale fecale sospeso in **brodo di arricchimento** [acqua peptonata (pH 8,0), tellurito con Sali biliari (pH9,0); dopo incubazione (6-8 ore), sottocoltura su terreni solidi selettivi.

## Immunodosaggio

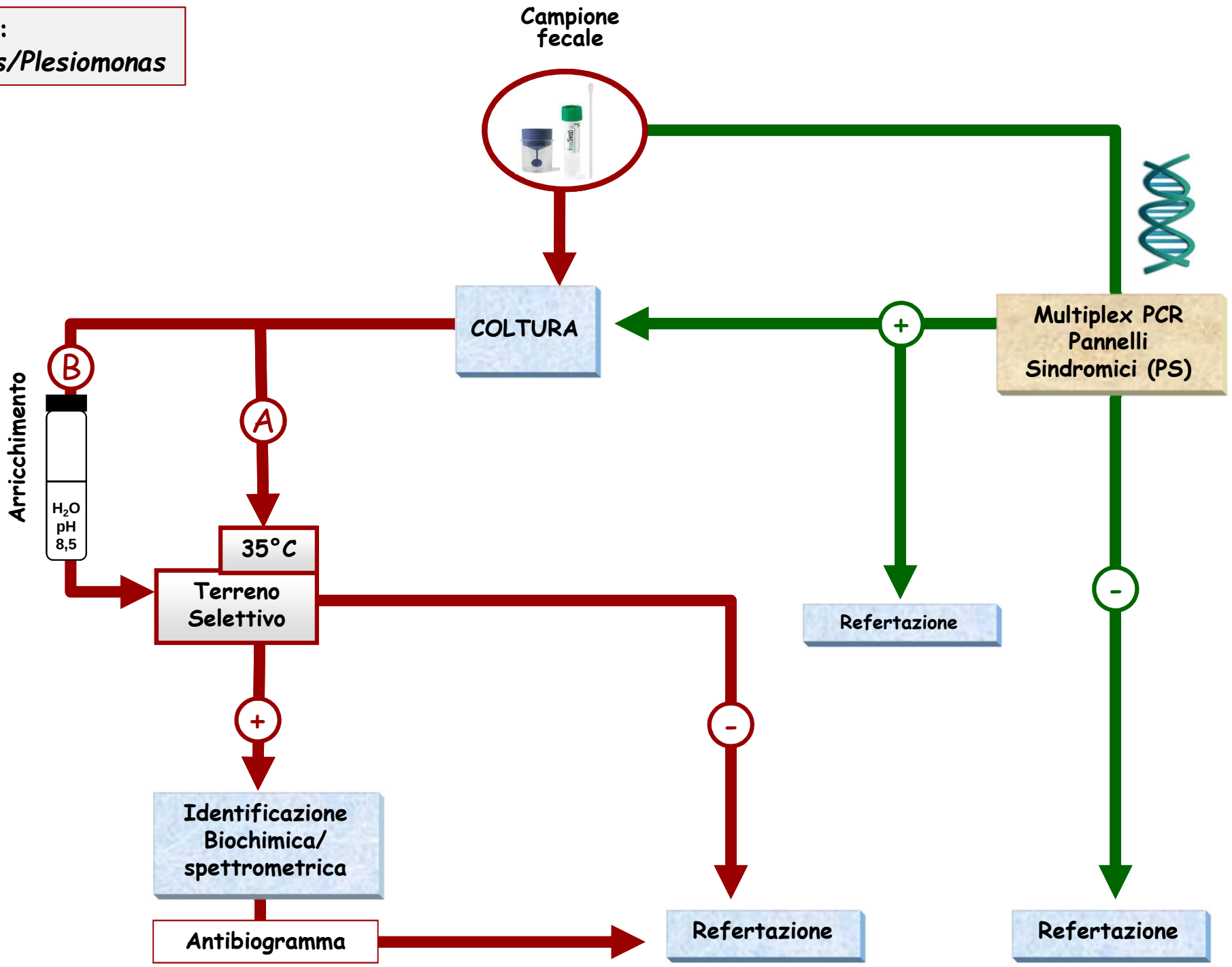
A Esistono sistemi immunoenzimatici (ELISA) e sistemi di agglutinazione passiva inversa al lattice (RPLA) per la determinazione dell'enterotossina di V.cholerae (CT).

B Esistono sistemi diagnostici rapidi (RDT) (immunoenzimatici, immunocromatografici) per il rilevamento di antigeni specifici di *V. cholerae*. I test RDT possono essere considerati uno strumento investigativo in setting epidemici.

## Dosaggio molecolare

Sono stati sviluppati sistemi multiplex e pannelli sindromici (PS) per l'individuazione di patogeni enterici batterici, virali e parassitari. I PS, nella maggior parte dei casi, vanno ad aggiungersi, integrando e non sostituendo, le metodiche diagnostiche tradizionali che risultano ancora necessarie, per avere a disposizione gli isolati microbici su cui eseguire saggi fenotipici.

**Ricerca di:**
***Aeromonas/Plesiomonas***



## COLTURA

**A** Semina diretta: il materiale fecale va sospeso in soluzione fisiologica (diluizione 1:10); alcune gocce di sospensione fecale vanno seminate su **terreni di coltura selettivi** (*Aeromonas* selective agar, CIN agar modificato ) e incubate in **aerobiosi** a **35°C**.

**B** Semina con arricchimento: materiale fecale sospeso in acqua peptonata (pH 8.5 ); dopo incubazione, sottocoltura su terreni solidi selettivi.

## Dosaggio molecolare

Sono stati sviluppati sistemi multiplex e pannelli sindromici (PS) per l'individuazione di patogeni enterici batterici, virali e parassitari. I PS, nella maggior parte dei casi, vanno ad aggiungersi, integrando e non sostituendo, le metodiche diagnostiche tradizionali che risultano ancora necessarie, per avere a disposizione gli isolati microbici su cui eseguire saggi fenotipici.

Ricerca di: *C.difficile*

Campione fecale

EIA

Antigene GDH

A

COLTURA (CCFA)

Tossine A/B

NAAT (RT-PCR, LAMP)

Multiplex PCR Pannelli Sindromici (PS)

NAAT

**Refertazione:**

- Assenza di *C.difficile*
- Presenza di *C.difficile* tossinogenico
- Presenza di *C.difficile* tossinogenico
- Assenza di *C.difficile* tossinogenico
- Presenza di *C.difficile* tossinogenico
- Presenza di *C.difficile* tossinogenico

## Immunodosaggio (EIA)

Determinazione **dell'antigene comune** (glutammato deidrogenasi - GDH) proteina non tossinica associata a *C.difficile*. In caso di positività, è necessaria una conferma con un *test* più specifico per la dimostrazione della presenza di stipiti produttori di tossina. Ricerca delle **tossine A/B** con metodiche immudoenzimatiche (EIA) o immunocromatografiche (IC): sistemi mirati all'evidenziazione delle tossine A/B di *C. difficile* e che consentono di ottenere un risultato in meno di 1 ora; rispetto al test antigenico, il rilevamento delle tossine risente maggiormente delle modalità di conservazione del campione: le tossine si degradano rapidamente se il campione non viene conservato a 2°- 8°C. I test EIA che rilevano entrambe le tossine sono considerati più appropriati: la ricerca della sola tossina A è sconsigliata per la presenza di ceppi produttori della sola tossina B, tenendo presente che vi sono segnalazioni di CDI dovute a ceppi produttori della sola tossina A.

## Dosaggio molecolare

Per *C.difficile* si sono disponibili *test* in *real-time* PCR in grado di rilevare, a partire dal campione, geni della tossina B e di quella binaria. Sono anche disponibili sistemi basati sull'amplificazione isotermica mediata da loop (LAMP), che richiedono attrezzature meno costose, e diverse piattaforme sindromiche multiplex in grado di rilevare i principali agenti causali della diarrea infettiva tra batteri, virus e protozoi.
I costi ancora elevati suggeriscono l'impiego dei sistemi molecolari come test di conferma in seguito a screening con sistemi immunoenzimatici (GDH e tossine A/B), anche in considerazione della possibile sovradiagnosi di CDI per il rilevamento di portatori asintomatici di *C. difficile* tossinogenico in assenza di produzione effettiva di tossine. Inoltre, la colonizzazione da *C. difficile* (compresi *C. difficile* con i geni della tossina) può verificarsi in alcuni gruppi di popolazione, come i bambini, in particolare quelli con malattia infiammatoria intestinale.
Nonostante alcuni studi abbiano riportato che la produzione di tossina binaria (CDT), in aggiunta a TcdA e TcdB, possa essere associata a forme più gravi di malattia e ad un rischio più elevato di recidiva, la presenza e il significato della tossina binaria rimangono tuttora incerti.

## COLTURA

**A** Esistono terreni selettivi specifici per la crescita di CD come CCFA (cicloserina cefoxitina fruttosio agar) nei quali sospensioni fecali possono essere direttamente inoculate e incubate per 48 ore in anaerobiosi. Il pretrattamento delle feci mediante shock etanolico aumenta la sensibilità della coltura, favorendo la crescita di *Clostridium*. La coltura, presso i Centri di riferimento che la eseguono, è riservata o ai campioni risultati positivi alla ricerca della tossina, per finalità epidemiologiche o per saggi di sensibilità, o a quelli risultati negativi alla ricerca della tossina per un ulteriore saggio di tossigenicità, ove persista il sospetto clinico.

**Ricerca di:**
***Virus enterici***

**Campione fecale**

***Rotavirus*** | ***Adenovirus*** | ***Norovirus***

**Tests immunoenzimatici ①**

**RT-PCR**

**Multiplex PCR Pannelli Sindromici (PS)**

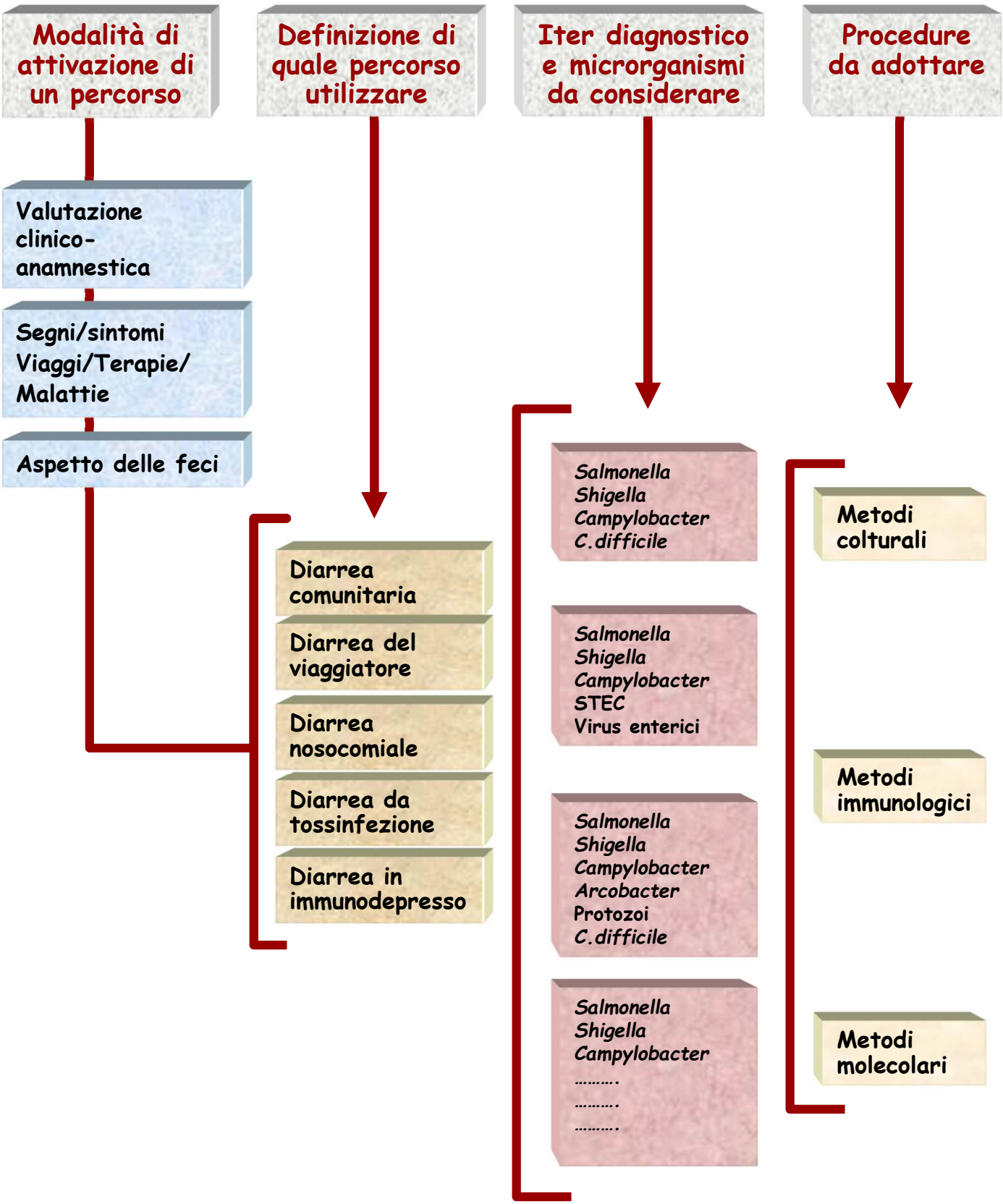
*Rotavirus*
*Adenovirus*
*Norovirus*
*Astrovirus*
*Sapovirus*

**Interpretazione:**
**Presenza di**
***Rotavirus/Adenovirus/Norovirus***

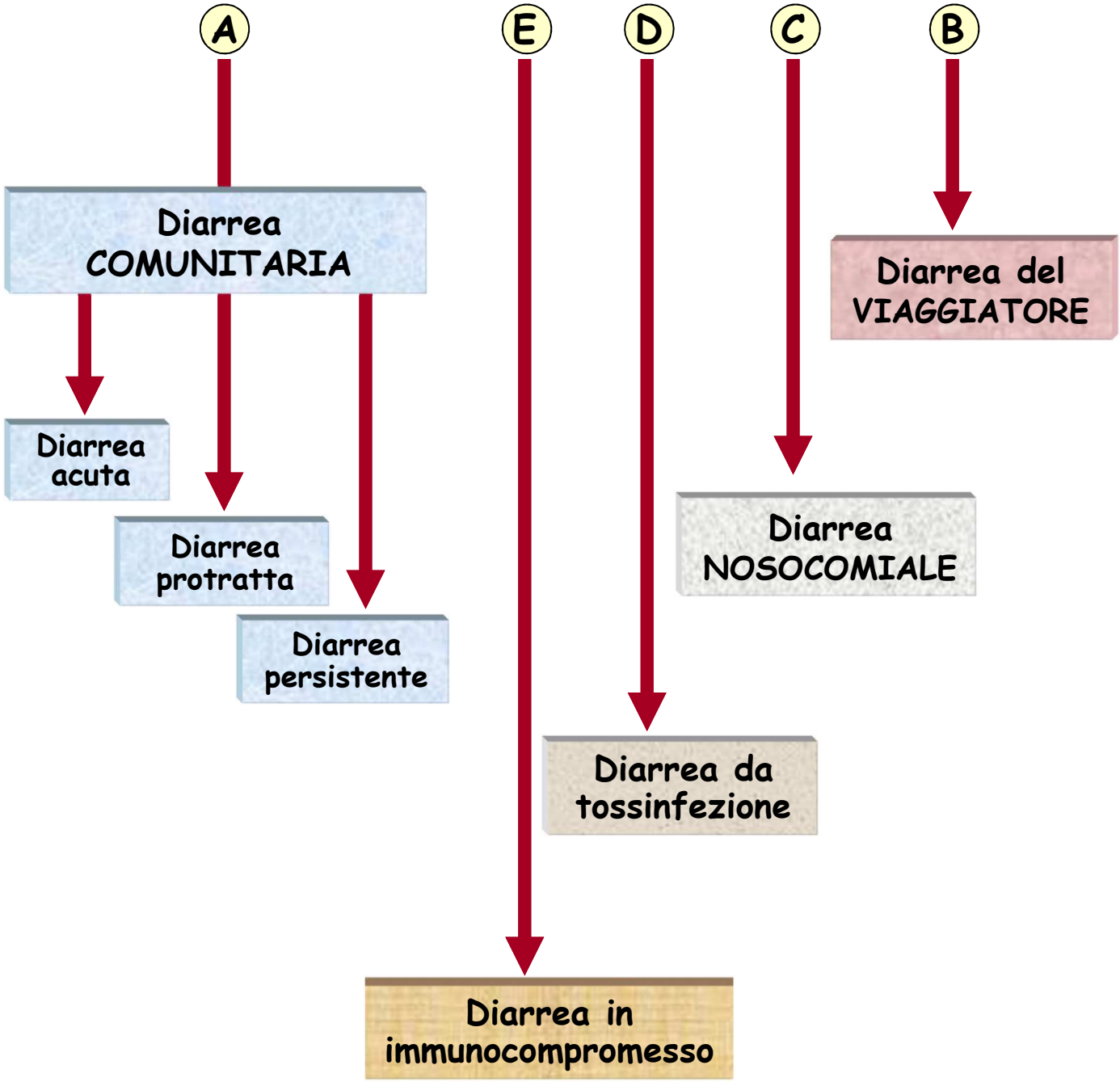
**Tipizzazione ©**
**③ ③ ④**

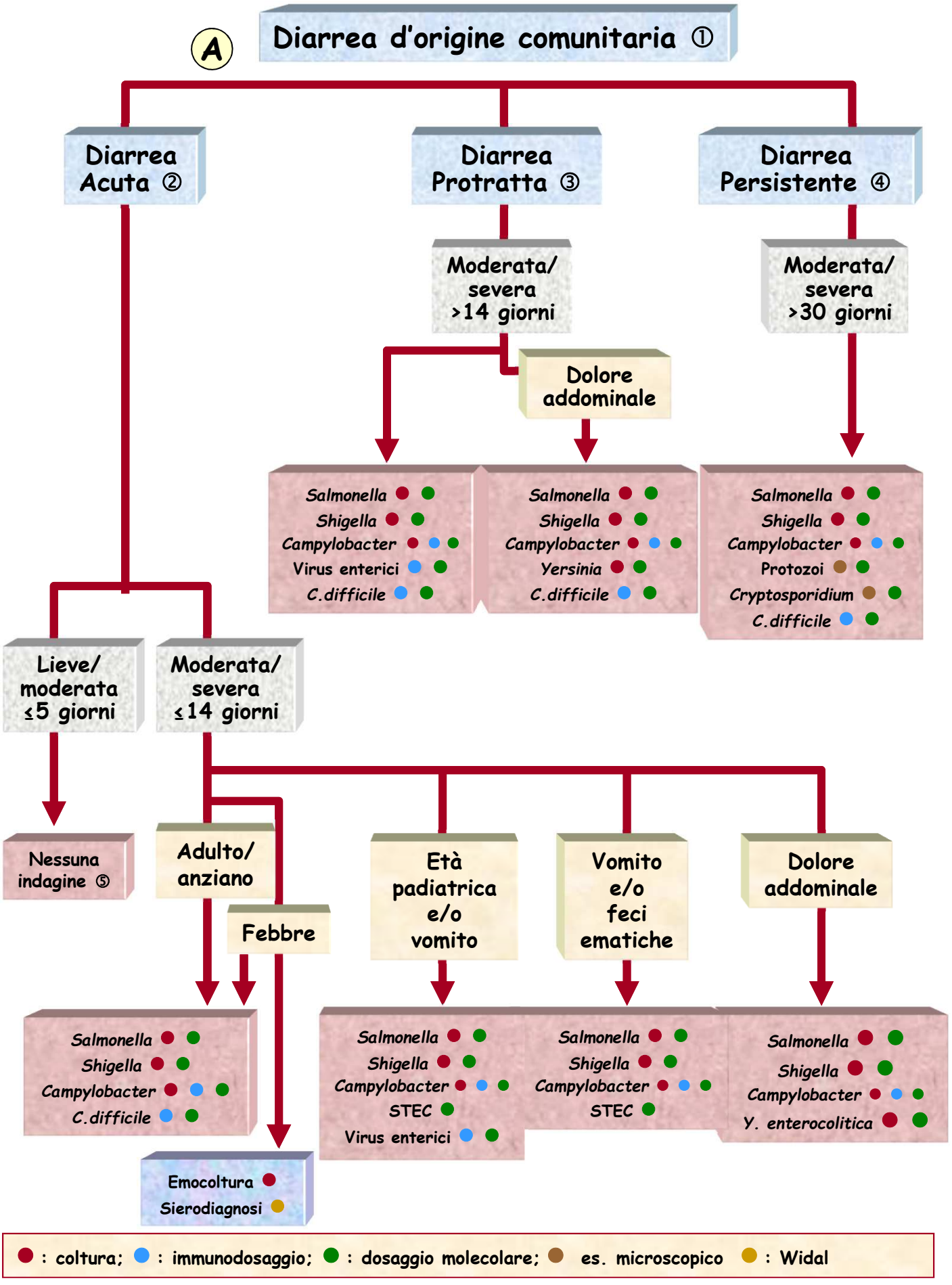
**①: ELISA, Immunocromatografia; ② sequenziamento genomico; ③ Microscopia Elettronica; ④ immunomicroscopia elettronica**
**© Centri di Riferimanto**

# DIARREA D'ORIGINE INFETTIVA
## PERCORSI



# DIARREA D'ORIGINE INFETTIVA
## PERCORSI




A
Diarrea d'origine comunitaria ①
Diarrea Acuta ②
Diarrea Protratta ③
Diarrea Persistente ④
Moderata/ severa >14 giorni
Moderata/ severa >30 giorni
Dolore addominale
Salmonella
Shigella
Campylobacter
Virus enterici
C.difficile
Salmonella
Shigella
Campylobacter
Yersinia
C.difficile
Salmonella
Shigella
Campylobacter
Protozoi
Cryptosporidium
C.difficile
Lieve/ moderata ≤5 giorni
Moderata/ severa ≤14 giorni
Nessuna indagine ⑤
Adulto/ anziano
Febbre
Età padiatrica e/o vomito
Vomito e/o feci ematiche
Dolore addominale
Salmonella
Shigella
Campylobacter
C.difficile
Salmonella
Shigella
Campylobacter
STEC
Virus enterici
Salmonella
Shigella
Campylobacter
STEC
Salmonella
Shigella
Campylobacter
Y. enterocolitica
Emocoltura
Sierodiagnosi
● : coltura; ● : immunodosaggio; ● : dosaggio molecolare; ● es. microscopico ● : Widal

## Legenda

① patologia insorta in comunità o entro 48 ore dal ricovero in paziente che non sia stato ricoverato in ospedale /struttura sanitaria nei precedenti 3 mesi

② la diarrea acuta è da ritenersi un episodio con sintomatologia di durata inferiore a 14 giorni

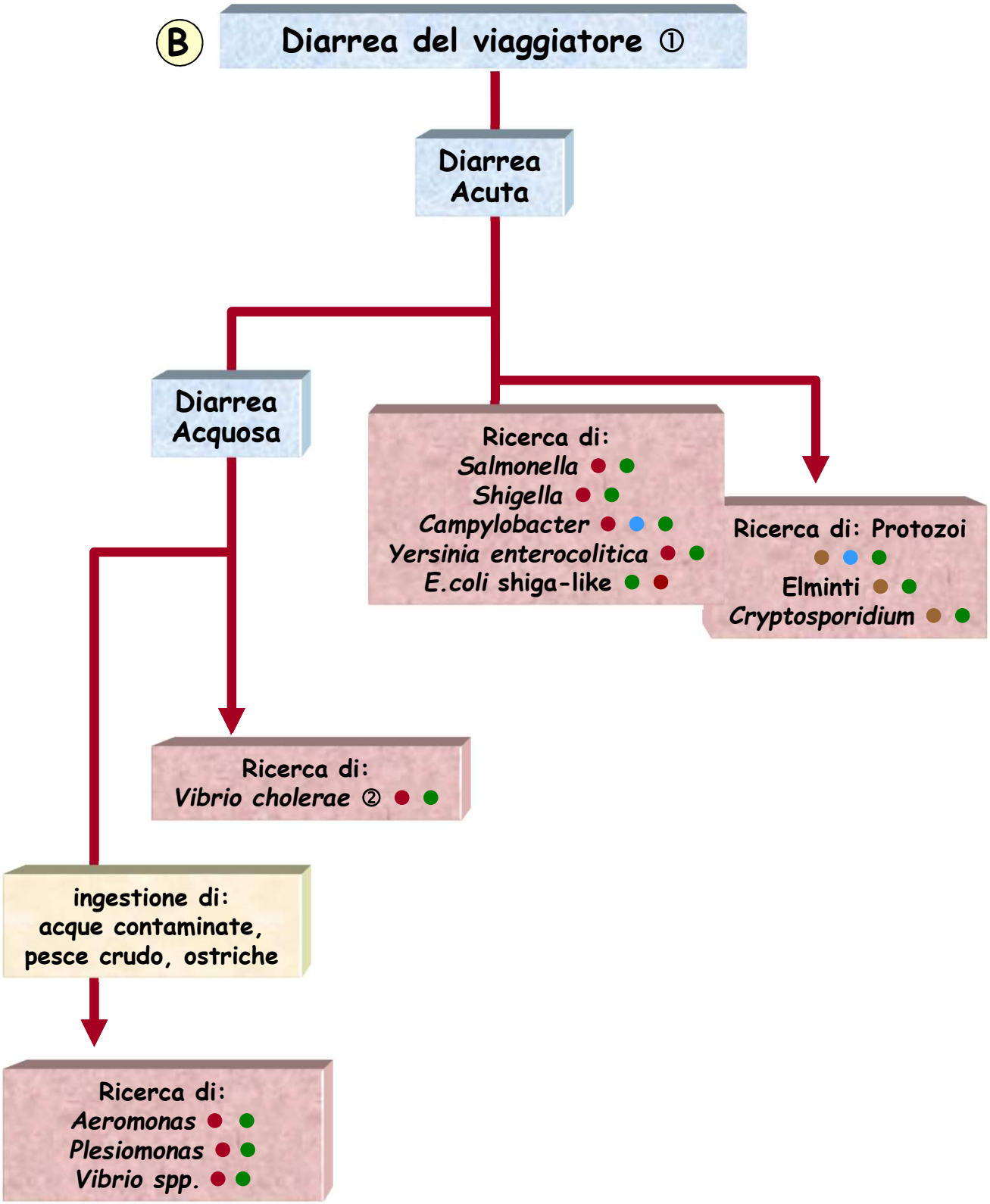
③ la diarrea protratta è da ritenersi un episodio con sintomatologia di durata superiore a 14 giorni

④ la diarrea persistente è da ritenersi un episodio con sintomatologia di durata superiore a 30 giorni

⑤ Un campione di feci per analisi microbiologica può essere appropriato se il motivo dell'indagine è di interesse per la salute pubblica:

- attività occupazionale (es.manipolatore di alimenti, lavoratori per cure assistenziali)
- quando cibi o acque del servizio pubblico alimentare possono essere fattori di rischio
- se il paziente è sospetto o responsabile di un'epidemia comunitaria

Un campione di feci per ricerca di virus enterici può essere appropriato se il paziente risiede o lavora in un centro di assistenza continua dove si è manifestato un evento diarroico epidemico




● : coltura; ● : immunodosaggio; ● : dosaggio molecolare; ● es. microscopico

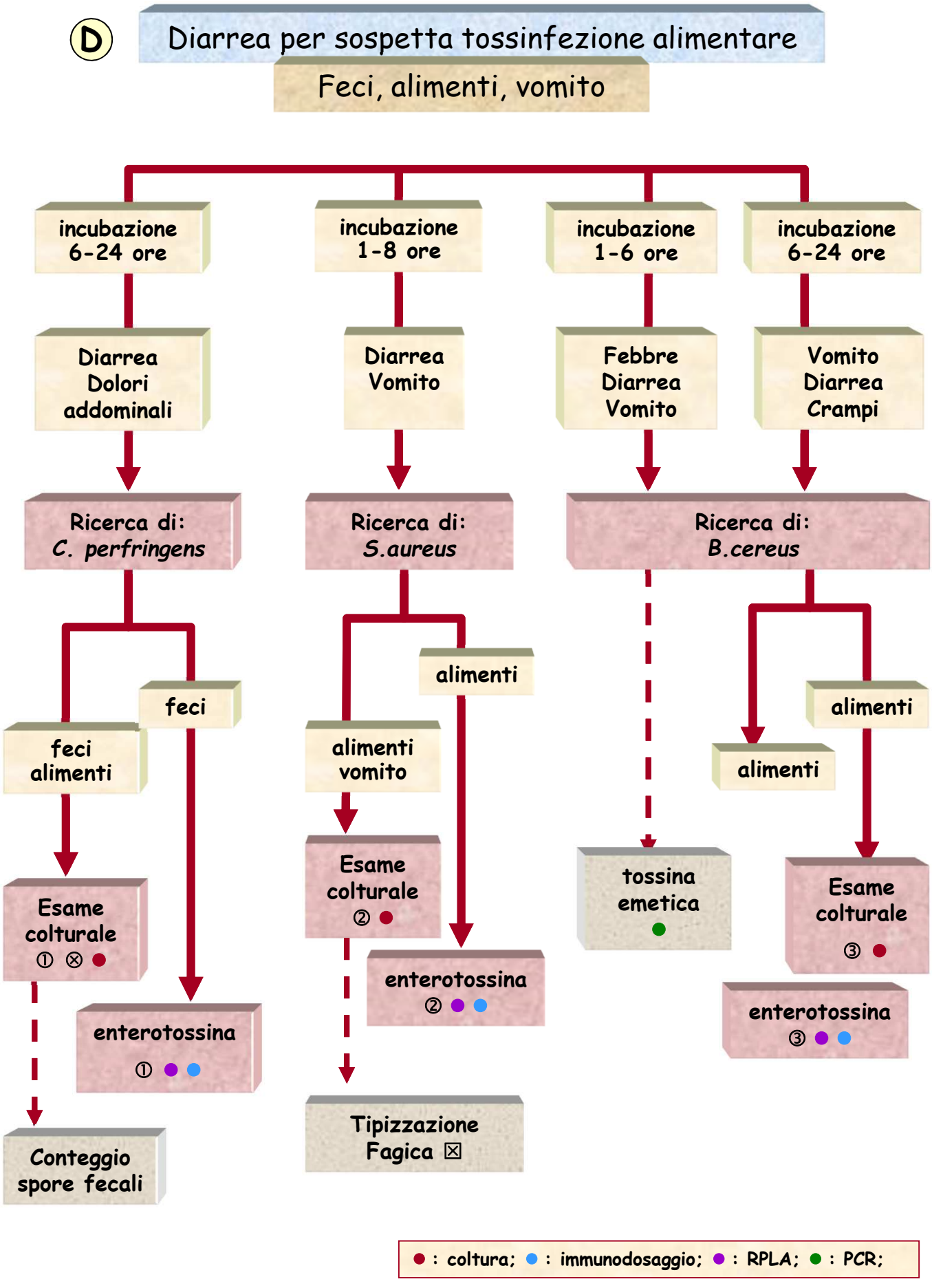
## Legenda

① La diarrea del viaggiatore è una condizione definita dalle circostanze di acquisizione e non da un particolare sintomo o da una particolare eziologia (diarrea di natura infettiva in un ospite suscettibile in situazioni dove il rischio di esposizione è maggiore).
Circa il 20-50% dei viaggiatori che viaggiano in qualsiasi parte del mondo, ma in particolare nelle zone a basso controllo igienico e a clima caldo, sono soggetti ad almeno un episodio di diarrea durante il viaggio o al rientro.
La frequenza delle singole specie chiamate in causa è risultata poter cambiare notevolmente a seconda delle aree geografiche interessate.

② la ricerca è prevista per soggetti provenienti da aree endemico-epidemiche

## C Diarrea NOSOCOMIALE (AAD, AAC, AAPMC) ①

① Si rimanda alla flow-chart 2:
ricerca *Clostridioides difficile*


D
Diarrea per sospetta tossinfezione alimentare
Feci, alimenti, vomito
incubazione 6-24 ore
incubazione 1-8 ore
incubazione 1-6 ore
incubazione 6-24 ore
Diarrea Dolori addominali
Diarrea Vomito
Febbre Diarrea Vomito
Vomito Diarrea Crampi
Ricerca di: C. perfringens
Ricerca di: S.aureus
Ricerca di: B.cereus
feci
feci alimenti
alimenti
alimenti vomito
alimenti
alimenti
Esame colturale ① ⊗ ●
enterotossina ① ● ●
Conteggio spore fecali
Esame colturale ② ●
enterotossina ② ● ●
Tipizzazione Fagica ☒
tossina emetica ●
Esame colturale ③ ●
enterotossina ③ ● ●
● : coltura; ● : immunodosaggio; ● : RPLA; ● : PCR;

## Legenda

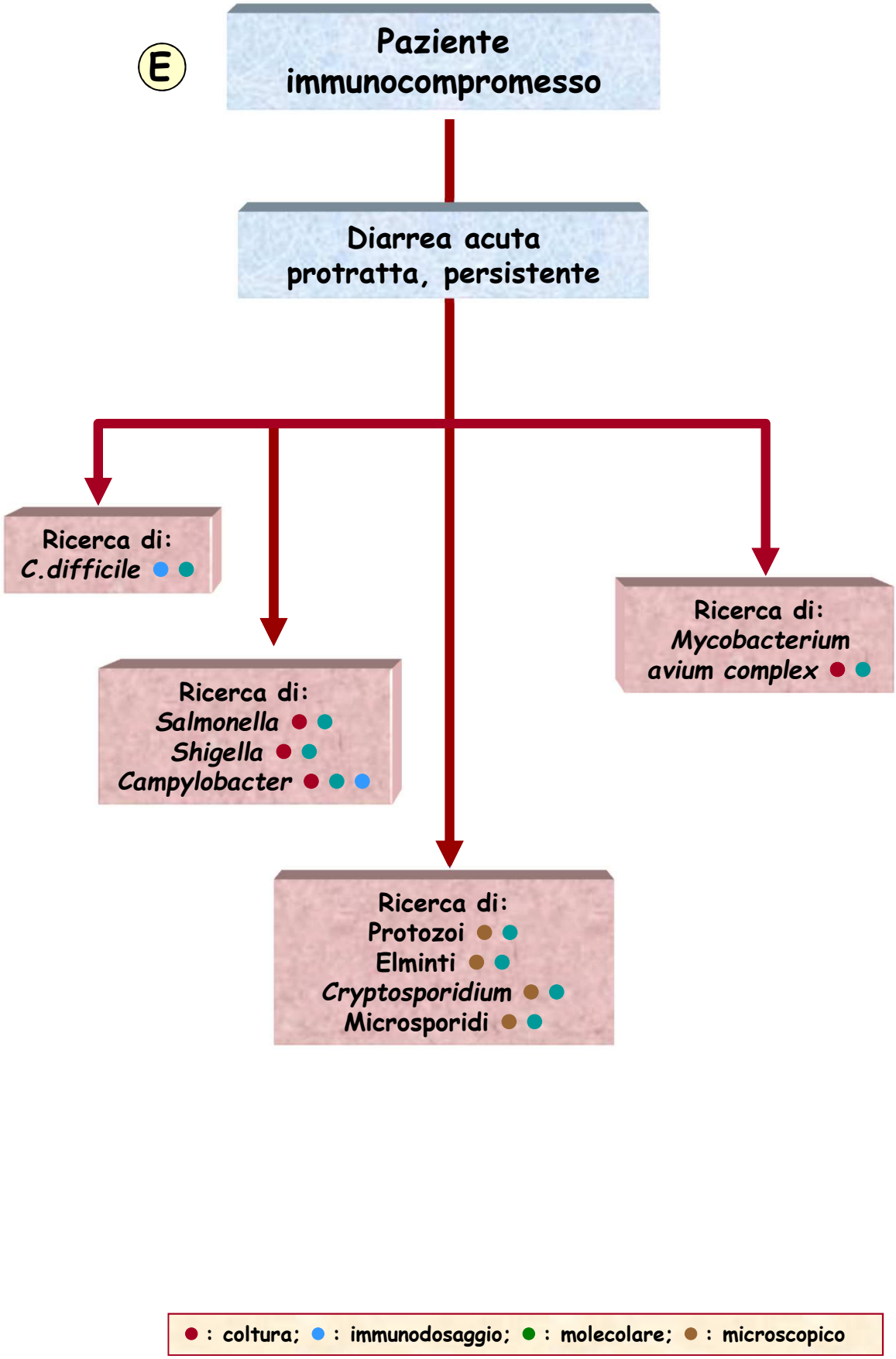
① per *C.perfringens* è prevista la coltura quantitativa delle feci e degli alimenti e/o la ricerca della enterotossina nelle feci con tecniche RPLA/ELISA

② per *S.aureus* è prevista la coltura dagli alimenti e/o dal vomito; la ricerca dell'enterotossina è possibile con tecniche RPLA/ELISA direttamente solo nell'alimento o eventualmente dal ceppo isolato

③ per *B.cereus* (forma diarroica) è prevista la coltura quantitativa degli alimenti e/o la ricerca della enterotossina con tecniche RPLA/ELISA direttamente solo nell'alimento o dal ceppo isolato.

⊗: > $10^5$/g. (dopo shock etanolico)

☒: la tipizzazione fagica può essere utilizzata per dimostrare la presenza dello stesso fagotipo nelle feci e negli alimenti


E
Paziente immunocompromesso
Diarrea acuta protratta, persistente
Ricerca di:
C.difficile
Ricerca di:
Salmonella
Shigella
Campylobacter
Ricerca di:
Mycobacterium avium complex
Ricerca di:
Protozoi
Elminti
Cryptosporidium
Microsporidi
: coltura; : immunodosaggio; : molecolare; : microscopico