

BIBLIOGRAFIA *selezionata*

Amebe-antimicrobici-EMB metodi diagnostici-infezioni materno fetali e neonatali-micobatteriologia-virologia aggiornamenti tecnici

AMEBE

a cura di **MANUELA PEGORARO**

Marciano-Cabral F. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans, *Clinical Microbiology Reviews* 2003;16(2):273-307

Nel lavoro, completo ed esaustivo, vengono affrontate le possibilità diagnostiche, così come le caratteristiche biologiche, epidemiologiche, immunologiche e patogenetiche, cliniche e terapeutiche di queste particolari amebe a vita libera. Mentre il coinvolgimento encefalico e cutaneo sembra essere appannaggio soprattutto dei pazienti immunocompromessi, le patologie della cornea (sostenute da A. Castellani e altre 7 specie) si configurano come malattie non opportunistiche e sono strettamente correlate all'uso di lenti a contatto. Si tratta in ogni caso di patologie gravi in cui le difficoltà terapeutiche si aggiungono a diagnosi spesso tardive. Le possibilità diagnostiche includono osservazioni microscopiche dirette, colorazioni specifiche, colture, indagini istologiche e tecniche di biologia molecolare

Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas, *Clinical Microbiology Reviews* 2003;15 (3):342-348

Dopo un breve inquadramento clinico-epidemiologico dei tre principali generi di amebe a vita libera responsabili (seppure con frequenza diversa) di infezioni umane il lavoro confronta in maniera dettagliata vari terreni axenici formulati per il contenimento in coltura di *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris* in termini di resa, tempi di generazione, specie (patogene o non) coltivabili. Per *Naegleria* e *Acanthamoeba* l'isolamento primario prevede un terreno xenico (batterizzato), *Balamuthia* (comunque più esigente) richiede invece colture cellulari. Vengono infine fornite utili indicazioni tecniche per l'isolamento e l'identificazione di queste amebe a partire da campioni clinici e ambientali

Steinberg JP, Galindo RL, Kraus ES, Ghanem KG. Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review-*Clinical infectious disease* 2002;35:E43-49

A partire dalla descrizione dettagliata di un caso di acantomebiasi disseminata ad esito fatale in un paziente sottoposto a trapianto di rene, viene riportata una revisione di pochi casi (8 fino al 2002, secondo il lavoro) descritti in letteratura di acantamebiasi disseminata in soggetti non HIV-positivi. Anche in questi pazienti le lesioni cutanee, generalmente multiple, sono spesso la prima manifestazione della malattia ma le difficoltà a caratterizzarle dal punto di vista istopatologico hanno portato a confonderle con quadri legati ad infezioni micotiche, virali, micobatteriche. Viene perciò sottolineata la necessità di tenere in considerazione, fra le ipotesi eziologiche, anche l'infezione da *Acanthamoeba* spp. in pazienti immunocompromessi con lesioni cutanee nodulari non responsive alla terapia antibiotica, dal momento che il coinvolgimento del SNC aggrava notevolmente la prognosi innalzando l'indice di mortalità (peraltro già alto) al 100%

Szènasi Z, Endo K, Yagita E, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of "free-living" amoeba causing human disease-*J Medical Microbiology* 1998;(47):6-16

Lo studio dei patterns isoenzimatici di ceppi di *Naegleria* spp. e *Acanthamoeba* spp. coltivati in terreni axenici, la reattività nei confronti di anticorpi monoclonali specie specifici e l'applicazione di indagini molecolari (come l'analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione del DNA cellulare e mitocondriale) hanno evidenziato la precarietà delle classificazioni tassonomiche precedenti basate su criteri morfologici e della definizione stessa di patogenicità assegnata ad una determinata specie in base alla termofilia (per quanto riguarda *Naegleria* spp.) o alla capacità di dare malattia nell'animale. Il lavoro presenta in maniera chiara le potenzialità dei metodi di indagine soprattutto nello studio di questi protozoi e la necessità di una loro applicazione in indagini epidemiologiche volte a correlare i ceppi di isolamento clinico con gli isolati ambientali ed evidenza quanto siano in realtà complesse e ancora molto poco conosciute le variazioni intra-specie e le correlazioni intra-specie

Boon GC, Kelly DJ, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam SC, Byers TJ, Fuerst PA. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolated from corneal scrape specimens contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* Keratitis in patients in Hong Kong-*J Clinical Microbiology* 2002;40(5):1621-1623

Il lavoro riporta i risultati ottenuti dall'applicazione di un metodo molecolare allo studio epidemiologico di 9 casi di cheratite osservati a Hong Kong. Il metodo si basa sull'analisi di una sequenza particolarmente variabile (DF3) nell'ambito del gene Rns (rRNA) al fine di correlare i ceppi isolati da scrapings corneali con i ceppi isolati a partire dalle lenti di contatto dei rispettivi pazienti e da campioni di acqua prelevati nelle loro case. Lo studio che conferma la prevalenza di uno specifico genotipo (T4) nei quadri di cheratite amebica, è solo uno degli esempi di metodiche molecolari applicate allo studio di queste amebe

ANTIBIOTICI

a cura di **SERGIO FRUGONI**

ERTAPENEM

Livermore DM, Sefton AM, Scott GM. Properties and potential of ertapenem. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Sep;52(3):331-44.

Lo spettro di azione di ertapenem è lo stesso di imipenem e meropenem verso specie diverse di microrganismi, ma si mostra meno attivo nei confronti di microrganismi non fermentanti. Ertapenem è attivo anche nei confronti di ceppi produttori di β -lattamasi ad ampio spettro o con AmpC. Un uso generalizzato del farmaco può selezionare resistenti, pertanto è buona norma tenere sotto controllo l'utilizzo di questo antibiotico.

Loza E, Morosini MI, Canton R, Almaraz F, Reig M, Baquero F. Comparative in vitro activity of ertapenem against aerobic and anaerobic bacteria.

Rev Esp Quimioter. 2003 Jun;16(2):209-15.

È stata valutata e paragonata l'attività in vitro di ertapenem e di altri antibiotici nei confronti di microrganismi aerobi ed anaerobi. Ertapenem potrebbe essere una valida alternativa ad associazioni antibiotiche in infezioni batteriche miste.

Cottagnoud P, Pfister M, Cottagnoud M, Acosta F, Tauber MG. Activities of ertapenem, a new long-acting carbapenem, against penicillin-sensitive or-resistant pneumococci in experimental meningitis. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Jun;47(6):1943-7.

Ertapenem, rispetto ad altri antibiotici normalmente utilizzati per infezioni meningee da pneumococco, mostra una diffusione migliore nelle meningi infiammate e non.

Gesser RM, McCarroll K, Tepler H, Woods GL. Efficacy of ertapenem in the treatment of serious infections caused by Enterobacteriaceae: analysis of pooled clinical trial data. J Antimicrob Chemother. 2003 May;51(5):1253-60.

In studi condotti in doppio cieco in oltre 1000 pazienti con infezioni da Enterobacteriaceae, la terapia con ertapenem alla dose di 1g/die in monodose, è risultata pari a quella effettuata con piperacillina/tazobactam alla dose di 3.37 g ogni 6 ore o ceftriaxone alla dose di 1g/die in monosomministrazione.

EVIDENCE-BASED MEDICINE

a cura di **Giuseppe Giocoli**

Validation of a decision rule identifying febrile young girls at high risk for urinary tract infection. MH Gorelick, A Hoberman, D Kearney et al. Ped Emerg Care 2003; 19, 162-4

Una decision rule è un modo di suggerire al clinico iniziative assistenziali, specie in condizioni di emergenza, sulla base di dati clinici ottenibili con relativa rapidità. La regola di cui si parla in questo lavoro invita eseguire l'urinocoltura in bambine da 0 a 2 anni con sospetta IVU solo se sono presenti 2 o 3 di cinque variabili clinico-epidemiologiche (intensità e durata della febbre, età inf. ad 1 anno, razza bianca, assenza di altri sintomi). Lo scopo è di evitare urocolture inutili e in conseguenza di diminuire i falsi positivi e i trattamenti antibiotici inappropriati. Interessante è l'architettura di questa ricerca, che comprende una fase di scelta delle variabili (analisi multivariata e uso delle odds ratio), poi uno studio osservazionale per misurare i valori predittivi di varie combinazioni delle variabili prescelte (una sola variabile, due, fino a tutte e cinque) in un ambiente ove la prevalenza delle IVU nelle bambine è di ca. 5% (pronto soccorso università). Fin qui si può parlare di una prediction rule. La decision rule subentra quando si decide il cutoff. Nello studio iniziale (derivation group, università di Philadelphia) il cutoff è la presenza di due variabili; nello studio di validazione esterna (validation group, università di Pittsburgh) di tre. Tuttavia un'analisi del potere discriminante globale delle due regole (eseguito con la determinazio-

ne dell'area sotto la curva ROC) ha dato risultati simili.

Validation and modification of streptococcal pharyngitis clinical prediction rules

TG Mcginn, J Deluca, SK Ahlawat et al. Mayo Clin Proc. 2003;78:289-293

Anche qui si tratta di una prediction rule, questa volta per decidere quando è conveniente eseguire la ricerca di *S.pyogenes* in soggetti con mal di gola. Di queste regole esistono numerose varianti: la più conosciuta è quella di Centor, trasformata (per gli adulti) in decision rule nelle raccomandazioni dell'American College of Physicians e dell'American Society for Internal Medicine: per eseguire la coltura o un test immunologico rapido le variabili presenti devono essere tre su cinque (minimo due) per i soggetti adulti (nei quali la prevalenza della faringite Strep A si aggira attorno al 12%). Per l'infanzia (prevalenza oltre il 30%) si discute molto ed uno degli oppositori all'applicazione delle regole in questa età è Alan Bisno, che invoca indagini d'impatto clinico.

BioMed Central pubblica un giornale sulla metodologia nella ricerca: *BMC Medical Research Methodology* <http://www.biomedcentral.com/bmcmedresmethodol>

BioMed Central è un'organizzazione che pubblica oltre 90 giornali di biologia e medicina, con accesso libero on-line. Uno di essi è *BMC Medical Research Methodology*, con articoli sui problemi metodologici della ricerca in campo sanitario, particolarmente studi clinici, revisioni sistematiche e metanalisi. Tra gli articoli più di frequente consultati sono segnalati:

- *The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel group randomized trials* (D Moher et al. *BMC Med Res Methodology* 2001, 1:2);

- *Sample size requirements for case-control study designs* (MD Edwards. *BMC Med Res Methodology* 2001, 1:11)

L'argomento principale è la disamina delle problematiche relative allo studio randomizzato e controllato, ma v'è da dire che quest'ultima architettura d'indagine (oltre ad essere usata per argomenti di nostra competenza, come la valutazione d'efficacia degli antibatterici) va estendendosi agli studi d'impatto clinico di metodi diagnostici, anche microbiologici.

Non mancheranno certo i riferimenti ai problemi relativi agli studi osservazionali, per i quali lo *STARD statement* è speculare al *CONSORT statement* per i trial randomizzati e controllati.

Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests; Draft Guidance. U.S. Dept of Health and Human Services. FDA-CDRH, Div of Biostatistics, Office of Surveillance and Biometrics. Released for comment on March 12, 2003 <http://www.fda.gov/cdrh/osb/guidance/1428.pdf>

L'US Dept of Health and Human Services ha emesso un documento provvisorio (aperto ai commenti di tutti) sulle metodologie appropriate per riportare i risultati degli studi di valutazione dei nuovi test diagnostici, con particolare riguardo alla cosiddetta "analisi di discrepanza". Quest'ultima viene adoperata, anche in moltis-

simi lavori di microbiologia clinica, quando non si dispone di gold standard perfetti per fare confronti negli studi osservazionali. L'eventualità è frequente, ad es. devo valutare un metodo per gli anticorpi contro un certo virus: per gold standard ho i risultati di tre EIA e l'accordo dev'essere con almeno due di essi. Quando ciò non accade (discrepanza), uso un altro gold standard (es un WB).

"No," dicono gli autori del documento, "tu non puoi decidere di usare un gold standard o l'altro proprio in base ai risultati del metodo che vuoi validare: ciò è sbagliato e antiscientifico".

È una pubblicazione di estrema importanza per tutti i microbiologi, che integra la molte volte citata STARD initiative.

INFEZIONI MATERNO FETALI E NEONATALI

a cura di LIDIA RICCI

Ismail E.A.R., Shafik M.H., Mutairi G.A.I. A Case of Non O : I *Vibrio Cholerae* Septicemia with Meningitis, Cerebral Abscess and Unilateral Hydrocephalus in a Preterm Baby. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:598-600

Viene descritto dagli autori un caso di infezione neonatale da *Vibrio cholerae* Non O:1 manifestatasi 60 ore dopo la nascita, in un neonato maschio. I primi segni dell'infezione erano riconducibili ad uno stato di inappetenza e di cianosi. L'evoluzione dell'infezione si è manifestata successivamente con episodi convulsivi e riscontro di un ascesso cerebrale. Dall'emocoltura è stato possibile effettuare il primo isolamento di *Vibrio cholerae* Non O:1 che ha consentito la diagnosi. Successivamente il germe è stato riscontrato anche in colture di feci, liquor ed urine. L'identificazione di genere e specie è stata eseguita con l'utilizzo di test biochimici e sierologici applicati al materiale di crescita prelevato dai terreni di coltura e dall'osservazione microscopica delle colonie, colorate secondo Gram. L'antibiogramma ha indicato una buona sensibilità verso la maggior parte delle classi di antibiotici. Nonostante il trattamento farmacologico il neonato è deceduto all'ottava settimana di vita per arresto cardio-circolatorio durante l'esecuzione della TAC cerebrale di controllo.

L'indagine epidemiologica, eseguita per tentare di risalire alla fonte di infezione, non ha dato buoni risultati.

Tutte le colture eseguite da vari materiali prelevati dalla madre hanno dato esito negativo. L'unico dato interessante emerso è quello relativo ad un abbondante consumo alimentare di pesce da parte della madre prima del parto. Da una revisione dei casi descritti in letteratura emerge che l'infezione da *Vibrio cholerae* Non O:1 è più frequentemente trasmessa per via oro-fecale o attraverso le mani degli operatori addetti alle cure dei neonati.

Hervas Ja, Ballesteros F, Alomar A, Gil J, Benedi VJ, Alberti S. Increase of *Enterobacter* in neonatal sepsis: a twenty-two-year study. *Pediatr Infect Dis* 2001 Feb; 20(2):134-40

Gli autori attraverso questo studio hanno raggiunto due obiettivi importanti:

a. revisione della letteratura sui casi di meningite neona-

tale per un periodo di 20 anni

b. studio epidemiologico con ribotipizzazione eseguito su isolati di *Enterobacter* per il periodo 1995-1997.

Lo studio delle sepsi e/o meningiti ha consentito di rilevare che *Enterobacter* spp. era stato il germe più frequentemente isolato nel periodo 1992-1998. I casi verificatisi erano 45, la ribotipizzazione eseguita sugli isolati batterici identificava 5 cloni diversi di *Enterobacter* spp. e di questi tre erano più frequenti.

Le misure di prevenzione messe in atto in seguito, basate soprattutto su norme igieniche, hanno ridotto a zero il numero degli isolamenti del genere *Enterobacter* confermando che tale germe causa infezioni nosocomiali trasmesse prevalentemente da paziente a paziente.

Park KH, Chaiworapongsa T, Kim YM, Espinoza J, et al. Matrix Metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *J Perinat Med* 2003; 31(1): 12-22
La rottura prematura delle membrane (PROM) e l'invasione batterica della cavità amniotica coincidono con la variazione di 3 Matrix-metalloproteina (MM-3) nel liquido amniotico?

I risultati di questo studio consentono tali conclusioni:

- a. MM-3 si riscontra nel liquido amniotico del 99,5% delle gravide
- b. L'incremento di MM-3 si verifica al momento del parto sia si tratti di un parto prematuro che a termine.
- c. PROM e parto pretermine non sono caratterizzati da un valore significativo di MM-3.
- d. L'invasione batterica nella cavità amniotica sembra indurre invece un particolare aumento del livello di MM-3

A conclusione dello studio si può affermare che MM-3 ha un ruolo nell'andamento del parto.

Jang TN, Fung CP, Yang TL, Shen SH, Huang CS, Lee SH. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate an outbreak of *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2001;48(1):13-9

Le tecniche di biologia molecolare sempre più accurate ed efficaci rappresentano uno strumento utile anche per lo studio delle infezioni neonatali in ambito nosocomiale. Vengono illustrati, dagli autori, i risultati ottenuti utilizzando la tecnica della pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) per caratterizzare 9 isolati di *Serratia marcescens* responsabile di infezioni neonatali in un'unità di terapia intensiva. La revisione degli episodi di infezione verificatisi comprendeva 4 casi di sepsi, 3 casi di polmonite, 1 caso di infezione della ferita ombelicale ed 1 caso di congiuntivite. Tutti i 9 isolati caratterizzati con la PFGE hanno mostrato lo stesso profilo genetico (pattern). Lo studio epidemiologico retrospettivo non ha consentito tuttavia di risalire alla fonte dell'infezione. *Serratia marcescens* è stata isolata dal lavandino e dalla porta dell'incubatrice. Gli autori concludono la descrizione dello studio raccomandando il lavaggio delle mani come efficace metodo di prevenzione

Smith JL. *Campylobacter jejuni* infection during pregnancy: long-term consequences of associated bacteremia, Guillain-Barre syndrome and reactive arthritis. *J Food Prot* 2002 Apr; 65(4): 696-708

La *Campylobacter* enterica è un'infezione a diffusione

BIBLIOGRAFIA

selezionata

sempre maggiore ma a carattere autolimitante. Dalla revisione letteraria si evince che l'infezione da *Campylobacter jejuni* contratta dal cibo durante la gravidanza è pericolosa per la madre ed il feto.

Il genere *Campylobacter* induce batteremia nella gravida infetta ma può anche causare infezione intrauterina del feto, aborto, parto emorragico e morte neonatale.

L'infezione contratta dal neonato dopo la nascita può provocare più frequentemente enterite ma anche sepsi e/o meningite.

La donna gravida infetta da *Campylobacter* può contrarre la sindrome di Guillain-Barré (GBS). Generalmente la sindrome non determina conseguenze sul feto, tuttavia può, in casi gravi, provocare aborto spontaneo al terzo trimestre di gravidanza. Altra grave conseguenza è l'artrite reattiva (ReA) che si verifica nel 2% dei soggetti con enterite da *Campylobacter jejuni*. Gli autori attraverso una revisione dei casi descritti in letteratura osservano che l'infezione da *Campylobacter jejuni* si contrae principalmente con l'ingestione di cibi infetti. Sarebbe pertanto auspicabile la raccomandazione da parte degli organi di prevenzione di regole per un corretto uso degli alimenti in fase di gravidanza.

Corinna A. Haberland, William E. Benitz, Gillian D. Sanders, et al. Perinatal screening for group B streptococci: Cost-benefit analysis of rapid polymerase chain reaction. *Pediatrics* 2002; 110(3): 471-480

E' noto che l'intervento di prevenzione delle infezioni su feto e neonato, da *Streptococco* di gruppo B (SGB) ha prodotto un'efficacia documentata dalla significativa diminuzione dei casi di decessi, infezioni neonatali e di gravi sequele. In questo studio sono analizzate tre possibili strategie ed il loro rapporto costo/beneficio.

- Utilizzo della PCR al momento dell'ammissione in ospedale per il parto
- Cultura del materiale retto-vaginale alla 35-37th settimana di gestazione.
- Screening per SGB al momento del parto per i soggetti con elevato fattore di rischio

I risultati dello studio documentano una maggior efficacia ed una riduzione dei costi con l'utilizzo della PCR rispetto agli altri metodi di prevenzione.

Fadiman KH, Goldman SM. American College of Preventive Medicine Practice Policy Statement Screening for *Chlamydia trachomatis*. *Am J Prev Med* 2003;24 (3) 287-292

Il collegio americano di medicina preventiva, in questo recentissimo lavoro, riferisce le sue raccomandazioni in tema d'infezioni da *Chlamydia trachomatis* per la tutela della gravidanza.

Nel documento redatto dal collegio multidisciplinare si raccomanda lo screening per la ricerca di *Chlamydia trachomatis*:

- durante il primo trimestre di gravidanza o durante la visita prenatale.
- controllo anche nel terzo trimestre di gravidanza per soggetti con importanti fattori di rischio.

Votava M, Tejkalova M, Drabkova M, Unzeitig V, Braveny I. Use of GBS for rapid detection of group B streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labor. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20(2):120-2
Compito del microbiologo è la valutazione dell'accuratezza dei test diagnostici, è pertanto utile questo studio di com-

parazione fra tre metodi per la coltura e ricerca di *Streptococchi* di gruppo B in donne gravide:

- utilizzo di brodo selettivo (Todd Hewitt) + subcoltura in Agar Sangue
- utilizzo di terreno agarizzato GBS
- utilizzo di terreno liquido GBS

Entrambi i terreni (b) e (c) producono pigmento arancione se presente streptococco B. La coltura eseguita dal materiale vaginale e rettale di 319 gravide ha consentito di osservare che su 638 tamponi testati con il metodo (a) si aveva crescita di *Streptococchi* di gruppo B in 134 casi, con il metodo (b) in 133 casi e con il metodo (c) in 126. Un controllo al momento del parto per ricerca di colonizzazione da streptococco di gruppo B ha consentito di identificare 87 portatrici con il metodo (a), 87 con l'utilizzo di GBS agar (metodo b) ed 86 con il metodo (c).

Dall'analisi dei risultati gli autori indicano che entrambi i terreni: GBS agar e GBS broth possono essere utilizzati per lo screening di *Streptococco* B sia sulla gravida che sul neonato.

Kim M, Kim G, Romero R, Shim SS, Kim EC, Yoon BH. Biovar diversity of *Ureaplasma urealyticum* in amniotic fluid: distribution, intrauterine inflammatory response and pregnancy outcomes. *J Perinat Med*. 2003;31(2):146-52.

Gli autori hanno esaminato la possibile correlazione tra il riscontro di *Ureaplasma urealyticum* biovar parvo e *U. urealyticum* biovar T960 con l'infiammazione uterina ed esito della gravidanza. Sono stati esaminati 77 soggetti alla 37.ma settimana di gravidanza utilizzando la tecnica di tipizzazione con PCR di *Ureaplasma urealyticum* riscontrato nel liquido amniotico. Il prelievo è stato eseguito con amniocentesi transplacentare ed è stata eseguita una coltura batterica per germi anaerobi ed aerobi. Lo stato di infiammazione del liquido amniotico è stato valutato con la conta dei leucociti e quantificazione di interleukina 6 (IL-6). I risultati dello studio indicano che:

- la specie biovar parvo è stata riscontrata nell'82% dei casi esaminati e biovar T960 nel 18%.
- non è stata osservata una differenza nell'esito della gravidanza tra infiammazione intramniotica da biovar parvo e biovar T960.

Craft Alissa, Neil Finer. Nosocomial Coagulase Negative Staphylococcal (CONS) Catheter-Related Sepsis in Preterm Infants: Definition, Diagnosis, Prophylaxis, and Prevention. *J perinatol* 2001; 21(3): 186-92

L'importanza della valutazione dell'accuratezza dei test e soprattutto lo studio della loro utilità scaturisce dalla lettura di questo studio.

Stafilococchi coagulasi negativi sono frequente causa di batteremia nelle unità di terapia intensiva per neonati di peso < 1 Kg. Non ci sono conformità scientifiche sulla definizione "d' infezioni vere", inoltre c'è l'esigenza di individuare test diagnostici che richiedano una quantità di sangue molto ridotta. Gli autori sottolineano la necessità di disporre di test con alta sensibilità e specificità onde stabilire se l'isolato batterico ottenuto dalla coltura è l'agente etiologico dell'infezione. Sarebbero sicuramente evitati trattamenti farmacologici eccessivi ed errati.

Shukla SKI, Vevea DN, Frank DN, Pace NR, Reed KD
Isolation and Characterization of black-pigmented

Corynebacterium spp. From a woman with spontaneous abortion. J Clin Microbiol 2001 Mar; 39 (3): 1109-13

Batteri inusuali possono essere agenti etiologici di infezione e gli autori descrivono un caso davvero insolito di isolamento di *Corynebacterium* spp. ,produttore di pigmento nero, dal tratto urogenitale di una donna che aveva abortito spontaneamente al sesto mese di gravidanza. Dal sequenziamento dei geni contenuti nella regione 16 S rRNA del genoma batterico è stato possibile caratterizzare il germe e collocarlo in un ramo filogenetico comprendente corinebatteri non coltivabili.

Probabilmente si tratta di una nuova specie ed attualmente è stata indicata come: CN-1 (ATCC 700975).

Bury RG, Tudehope D. Enteral Antibiotics for Preventing Necrotizing Enterocolitis in low Birthweight or Preterm infants. The Cochrane Library, Issue 1, 2003

Questo recente studio, effettuato con l'obiettivo di valutare l'utilità della terapia antibiotica enterale, per la prevenzione di enterocolite necrotizzante (NEC), rappresenta un buon esempio di metodo di lavoro offerto dall'EBM.

Sono ben descritti, infatti, i criteri con cui è stato condotto lo studio:

- a. studio randomizzato
- b. sono stati inclusi i neonati prematuri di basso peso
- c. è stato ben documentato il trattamento antibiotico enterale utilizzato
- d. la misura degli outcome si è basata sull'incidenza del numero dei casi di enterocolite necrotizzante (NEC) prima e dopo l'utilizzo di antibiotici, sul numero dei decessi, sui casi di enterite riscontrati e sui casi di colonizzazioni post-trattamento con ceppi batterici multiresistenti.

I risultati dello studio indicano che c'è evidenza sulla riduzione dei casi di NEC quando si esegue un trattamento profilattico con antibiotico somministrato per via enterale in neonati di basso peso.

C'è però anche evidenza in merito al riscontro di casi di colonizzazione con batteri resistenti dopo la terapia. Gli autori concludono pertanto che sono necessari altri studi, possibilmente su un numero consistente di neonati, per una corretta valutazione dei benefici e danni prodotti da questa strategia di prevenzione.

De La Cochetiere M.F, Piloquet H, Darmaun D, Galmiche J.P, Roze J.C. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: The putative role of *Clostridium*. Poster 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2003 Glasgow, UK

La colite necrotizzante (NEC) è una condizione patologica molto grave che può colpire il neonato. L'etiologia della NEC rimane sconosciuta e si suppone che la colonizzazione batterica iniziale possa avere un ruolo per la sua incidenza. Gli autori hanno condotto uno studio su 12 neonati prematuri ricoverati in un'unità di terapia intensiva, utilizzando la Polymerase chain reaction ed elettroforesi in gel d'agarosio della regione 16S dell'RNA ribosomiale del genoma batterico.

E' stato così osservato che *Clostridium perfringens* era presente a livello intestinale in tre neonati colpiti da colite necrotizzante e deceduti in seguito alla patologia. Il riscontro della banda caratterizzante geneticamente *Clostridium*

perfringens non era invece presente negli altri 9 neonati. Questo studio rappresenta probabilmente il primo caso, che consente di correlare la colonizzazione da *Clostridium perfringens* con lo sviluppo di colite necrotizzante utilizzando le tecniche di biologia molecolare basate sullo studio dei geni della regione 16S rRNA. Tali tecniche confrontate con i convenzionali metodi di coltura batterica sembrano consentire uno studio più rapido e completo della flora intestinale del neonato. Sarà possibile così studiare più approfonditamente gli eventi patologici gravi come la NEC che colpiscono i neonati prematuri.

Dammann O, Allerd EN, Genesi DR, Kundsinn RB, Leviton A. Antenatal Mycoplasma infection, the fetal inflammatory response and cerebral white matter damage in very- low- birthweight. Paediatr Perinat Epidemiol 2003;17(1):49-57

L'obiettivo di questo studio era di stabilire un'associazione statisticamente significativa fra presenza di *Mycoplasma hominis* ed *Ureaplasma urealyticum* nel liquido placentare e riscontro di vasculite nel neonato.

E' stato eseguito uno studio caso-controllo.

Dalla coltura della superficie del corion sono stati isolati *Mycoplasma hominis* nel 14% dei soggetti in studio e 2% nel gruppo di controllo ($P < 0,001$), *Ureaplasma urealyticum* invece è stato isolato in coltura nel 53% dei neonati di basso peso e 18% nel gruppo di controllo ($P < 0,001$). I risultati ottenuti confermano il sospetto di un possibile ruolo di *Mycoplasma hominis* ed *Ureaplasma urealyticum* nel provocare infiammazione fetale nei neonati di peso molto inferiore ai valori normali.

Hanson L, Korotkova M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. Seminars in Neonatology 2002; 4 (7): 275-281

Il sistema immunitario del neonato è molto limitato (basso livello di IgG) e le difese immunitarie si sviluppano progressivamente con la crescita. Normalmente il neonato è colonizzato con gli stessi microbi presenti nella flora intestinale della madre. Durante la fase dell'allattamento il neonato è protetto dalle infezioni attraverso i fattori difensivi contenuti nel latte materno. Uno di questi fattori è rappresentato dalla presenza di IgA secretorie contenute nei linfociti che sono presenti nelle ghiandole mammarie in fase di allattamento. Gli anticorpi di tipo IgA esercitano un'attività di barriera a livello della mucosa intestinale del neonato impedendo l'ingresso dei batteri. Sembra che questo il principale meccanismo di difesa del neonato dalle sepsi e da altre infezioni.

Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J. Micronutrients and Intrauterine Infection, Preterm Birth and Fetal Inflammation. J Nutr 2003, 133:1668S-1673S

La prematurità è causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo. L'infezione intrauterina è la causa più importante di parto prematuro. Nel 25% dei parti pretermine si riscontra una infezione batterica, prevalentemente subclinica, con riscontro di batteri nella cavità amniotica. L'infiammazione fetale conseguente è caratterizzata da handicap a lungo termine, danni cerebrali e displasia broncopolmonare. Gli autori hanno eseguito uno studio in una popolazione di gravide molto disagiate per valutare la correlazione fra carenza di vitamina C ed E e rottura prematura delle membrane (PROM). Sono stati analizzati anche altri studi

sulle infezioni fetali batteriche. Gli autori pur riscontrando una correlazione tra stato nutrizionale e PROM auspicano che altri eseguano studi clinici randomizzati per verificare se un'adeguata somministrazione di questi elementi possa ridurre gli effetti di infiammazioni fetali in pazienti con parto pretermine e con PROM.

Ormerod P. Tuberculosis in pregnancy and the puerperium. *Thorax* 2001; 56:494-499

Questa review sulla tubercolosi in gravidanza consente di osservare:

- a. Nel 19° secolo in base alle teorie Ippocratiche si riteneva che la donna gravida fosse meno predisposta alla tubercolosi. Dal 1998 si riscontra invece un incremento dei casi di tubercolosi in fase di gravidanza.
- b. La maggior parte dei casi si verifica nei paesi sottosviluppati ed in soggetti che concepiscono in età meno giovane.
- c. Lo screening delle gravide a rischio per la tubercolosi può essere eseguito con Skin-test. Non sembra che lo stato di gravidanza interferisca sull'interpretazione dei risultati (falsi positivi o falsi negativi)
- d. Il trattamento chemioterapico è compatibile con la fase dell'allattamento e non sembrerebbe creare un danno al neonato.
- e. La tubercolosi congenita si verifica per infezione del feto nell'utero attraverso il cordone ombelicale o per via ematogena.
- f. La localizzazione dell'infezione nella donna gravida è soprattutto polmonare.
- g. Gli outcome fetali variano con la precocità della diagnosi ed il sito di infezione nella madre (polmonare o extrapolmonare).
- h. Le conseguenze della tubercolosi polmonare contratta in gravidanza possono provocare: aborto, mortalità perinatale, pre-eclampsia, parto prematuro, basso peso del neonato e complicanze del parto.
- i. Segni e sintomi nel neonato infetto da Micobatteri sono simili a quelli da sifilide od infezioni da cytomegalovirus o nei casi di sepsi batteriche.

Hauth JC, Macpherson C, Carey JC, Klebanoff MA, Hillier SL, et al. Early pregnancy threshold vaginal pH and Gram stain score predictive of subsequent preterm birth in asymptomatic woman. *Am J Obstet Gynecol* 2003 mar; 188(3): 831-5

Gli autori descrivono uno studio multicentrico condotto su un gruppo di 21554 donne in fase di gravidanza. Su tutti i soggetti è stata eseguita la determinazione del pH vaginale.

Secondo questo dato sono stati suddivisi due gruppi uno formato da 6838 donne con pH < 4,5 ed uno score fra 9 e 10 calcolato secondo i criteri di Nugent, durante l'osservazione al microscopio del preparato colorato al Gram. L'altro costituito da 12,041 donne che hanno avuto una gravidanza regolare. Le conclusioni dello studio indicano che nei soggetti appartenenti al primo gruppo (pH 4,5 e score 9-10) si riscontra:

1. un incremento di parti pretermine alla 32th e prima della 35- 37th settimana di gestazione
2. nascita di neonati con un peso di 2500 gr o inferiore a 1500 gr.

Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Edwin S, Rathnasabapathy C. et al. Antimicrobial peptides in

amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003;13 (1):2-21.

Neutrofilii HNP 1-3, Proteine BPI e calprotectin MRP8/14 sono peptidi contenuti nei leucociti deputati alla risposta immune. Parto, PROM (rottura prematura delle membrane) e MIAC (invasione batterica della cavità amniotica) sono associati con variazione della concentrazione di questi peptidi nel liquido amniotico? Gli autori, di questo lavoro, per valutare tale correlazione hanno eseguito uno studio su 333 pazienti ripartite in 4 gruppi in base allo stato oggetto di valutazione. Dai risultati ottenuti si evince che:

- a. In caso di infezione intrauterina tutti i peptidi aumentano.
- b. Prom e parto prematuro incrementano significativamente la quantità di HNP 1-3, BPI e MRP8/14.
- c. Il parto a termine è associato ad aumento del peptide HNP 1-3
- d. Un elevato aumento di tutti e tre è riscontrabile nelle infezioni amniotiche, corioamniosite e parto pretermine non accompagnate da rottura prematura delle membrane.

Yoon BH, Romero R, Moon J, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Kim YM, Edwin S, et al. Differences in the fetal interleukin-6 response to microbial invasion of the amniotic cavity between term and preterm gestation. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003;13 (1):32-8.

Il riscontro di batteri nella cavità amniotica è frequentemente correlato con infiammazione fetale. Gli autori in questo studio hanno analizzato l'associazione tra presenza di batteri nella cavità amniotica e concentrazione d'interleukina-6

(IL-6) nel sangue prelevato dal cordone ombelicale sia nei casi di parti a termine che pretermine. Lo studio è stato condotto su 252 neonati dei quali 62 nati pretermine e 190 a termine.

Sul liquido amniotico prelevato è stata eseguita la coltura batterica e sul plasma del cordone ombelicale IL-6. Questi sono i risultati che gli autori descrivono:

- a. IL-6 è significativamente alta sia nei neonati a termine che pretermine (v.medio 13,4 pg/ml)
- b. IL-6 è presente in quantità più elevata quando la coltura batterica eseguita dal liquido amniotico è positiva (v.medio 31,6 pg/ml).

MICOBATTERIOLOGIA

a cura di FERRUCCIO MANDLER

Fukushima M, Kakinuma K, Hayashi H, Nagai H, Ito K, Kawakuchi R. Detection and identification of Mycobacterium species by DNA Microarray. *J Clin Microb* 2003;41:2605-2615

Trattasi di lavoro condotto da AA giapponesi di avanguardia in quanto impiega in micobatteriologia la tecnica dei microarray. Tecnica basata su gyrB gene della regione comune micobatterica e un set di probes specifici è stato spotted su un vetro preparato in modo da evidenziare i

casì positivi. Il test è stato valutato su 14 specie. Lettura a fluorescenza riprodotta nel testo. Preparazione del vetrino accuratamente descritta.

I risultati sono stati sovrapponibili se paragonati ai metodi amplificativi tradizionali. La possibilità di questa tecnologia ci appare enorme dal punto di vista diagnostico pratico

Gali N, Dominguez J, Blanco S, Prat C, Quesada MD, Matas L, Ausina V - Utility of In-house Mycobacteriophage-Based Assay for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates - J Clin Microb 2003;41:2647-2649

Gli AA di Barcellona hanno standardizzato su sistema microtiter la sensibilità alla RIF con tecnica del micobatteriofago D29 resistente alla infezione quando esposto alla RIF mentre è sensibile agli altri micobatteri. La standardizzazione basata su osservazioni di Wilson è una tecnica facile, poco costosa, adatta a tutti i laboratori. I micobatteriofagi, evidentemente, stabili, provengono dalla scuola di Igiene di Londra.

Moro A, Buratta M, Iurlo A, Cassetti T, Pasquale L, Sposini T, Mazzolla R, Bistoni F - Verifica di vitalità dei bacilli tubercolari in preparati microscopici per la colorazione di Ziehl-Neelsen - Microbiologia Medica 2003, 18(2), poster

Gli AA di Perugia hanno indagato la vitalità dei bacilli tubercolari sui vetrini ed eseguito esperimenti per l'inattivazione batterica impiegando calore, fenolo, raggi UV. Conclusione dei loro esperimenti che l'esposizione al calore ad 80°C per 2 ore ed il contatto per 30 minuti con il fenolo rappresentano il tempo minimo necessario per inattivare i bacilli tubercolari. Buona efficacia è dimostrata con i raggi UV dopo 24 ore di esposizione

Falkinham JO III - Mycobacterial aerosols and respiratory disease - Emerging Infect Diseases 2003;9(7):763-777

Micobatteri ambientali opportunisti inclusi MAC, M.terrae e la nuova specie di M.immunogenum sono stati implicati in episodi di polmonite ipersensitiva o altre affezioni polmonari. L'eventualità è stata attribuita ad aerosols di germi. Nel caso di M. immunogenum ad aerosol conseguente a operazioni di lavoro, tubi caldi ed alterazioni nei contenitori di acqua.

Sono possibili diverse modalità per contenere i fenomeni di aerosol. Si possono impiegare filtri, lampade ad UV, disinfezioni ad alte temperature (40°C) se i ceppi crescono a temperature inferiori (es 30°C), agenti o combinazione di questi aumentano le possibilità riduttive. La filtrazione può venir aumentata se i microrganismi vengono intrappolati in sostanze idrofobiche (paraffina).

Il lavoro contiene importanti capitoli sul fenomeno della ipersensibilità, granuloma da piscina, complicanze in seguito a tubi caldi, conseguenze da distruzione di case, resistenza alla disinfezione, cause di aerosolizzazione, valutazione sulla risposta immune

Silva VM, Kanaujia G, Gennaro ML, Menzies D - Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis - Int J Tuberc Lung Dis 2003;7(5):478-484

La risposta all'antigene 38kDa è risultata associata a malattia attiva in corso ed è risultata molto diversa della

risposta a 14kDa ed ESAT-6. Questi due antigeni sono risultati associati al fattore di rischio per una malattia attiva futura ma non in atto e suggerisce può essere utile per identificare le persone con elevato rischio di riattivazione di una malattia latente

Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD - Evaluation of the Microseq system for identification of Mycobacteria by 16S Ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical Mycobacteriology laboratory - J Clin Microb 2003;41:1447-1453

Il sistema MicroSeq 500 16S rDNA (Applied Biosystems Foster City, Calif) contiene una libreria di sequenze per batteri, funghi e micobatteri.

Eseguito l'identificazione dei Micobatteri con metodi fenotipici e con la sequenza 16S rDNA gli AA del lavoro, della Clinica Mayo di Rochester Minnesota, hanno identificato i ceppi isolati e di questi 219 su 243 risultavano concordanti ai metodi fenotipici.

Hanno ricordato specie nuove per un certo numero di isolati che elenchiamo: M cookii, M goodii, M heidelbergense, M hodleri, M madagascariense, M mageritense, M murale, M porcinum, M septicum, M tusciae. Si rifanno nella loro identificazione al sistema RIDOM (<http://www.ridom.com>) da noi già citato in MycoNews

Van Burg JH, Verver S, Borgdorff MW - The epidemiology of tuberculosis among asylum seekers in The Netherlands, implications for screening - Int J Tuberc Lung Dis 2003;7:139-144

La conclusione degli AA sui criteri di controllo per i soggetti frequentanti i posti di ricovero in modo particolare gli immigrati sono: 1. quelli con alterazioni radiologiche dovrebbero ricevere terapia preventiva dopo esclusione di una tb attiva 2. uno screening periodico non è indicato per gli immigrati provenienti da paesi dove si ha una bassa prevalenza di tb 3. bambini inferiori ai 12 anni vanno esclusi dallo screening

Shin S, Guerra D, Rich M e 8 coll - Treatment of multidrug-resistant tuberculosis during pregnancy: A report of 7 cases - Clin Infect Dis 2003;36:996-1003

Poco è noto sulla salvezza dei farmaci impiegati per trattare MDR-TB durante la gravidanza. Vengono descritte 7 pazienti trattate prima del parto e non sono state osservate complicanze ostetriche o trasmissioni perinatali. In tutti i casi risultati ottimi clinicamente

Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S, Niemann S - Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis Complex isolates - J Clin Microb 2003;41:2672-2675

La recente differenziazione del Mt complex in Mt, M bovis subs bovis, M. bovis subs caprae, M. bovis BCG, M. africanum sottotipo I e M. microti con M. canetti, M. africanum sottotipo II hanno portato gli AA di Borstel e Heidelberg a proporre una striscia DNA disponibile commercialmente (Genotype MTBC, Hain Lifescience GmbH, Nehr, Germania) utile particolarmente per la differenziazione dei membri della famiglia di Micobatterio tubercolare e del M. BCG. La striscia è basata su una sequenza gyrDNA posta su membrana.

I risultati sono stati ottimi e rimpiazzano tecniche differenziali sofisticate e legate a laboratori ultraspecialistici. A quando in Italia?

VIROLOGIA

a cura di GIGLIOLA FLAMMINIO

Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a new emerging respiratory infection in children. *Pediatrics*. 2003 Jun; 111:1407-10.

Le infezioni delle vie respiratorie sono causa di malattia e mortalità in tutto il mondo. Recentemente è stato identificato un nuovo virus del tratto respiratorio denominato "human metapneumovirus" (hMPV) in Olanda. Questo studio valuta la presenza di questo nuovo antigene e la sua correlazione con infezioni del tratto respiratorio. Sono stati esaminati 296 pazienti, di questi 19 (6.4%) hanno evidenziato infezione da hMPV. Questi pazienti presentavano manifestazioni cliniche come respiro affannoso, ipossia e possibili anomalie a livello radiologico. Solo per 1 di questi è stato necessario il ricovero in ospedale.

Baay MF, Herbrink P. Evaluating the presence of antibodies to HPV as prognostic markers in cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*. 2003 May; 89 (2): 338.

Foster WJ Jr, Kraus MD, Custer PL. Herpes simplex virus dacryoadenitis in an immunocompromised patient. *Arch. Ophthalmol*. 2003 Jun; 121 (6): 911-3.

Mori M, Imamura Y, Maegawa H, Yoshida H, Naiki H, Fu M. Cytology of pleural effusion associated with disseminated infection caused by varicella-zoster virus in an immunocompromised patient. A case report. *Acta Cytol*. 2003 May-Jun; 47 (3): 480-4.

L'interessamento pleurale in corso di varicella è molto raro. In questo studio viene analizzato un caso di una donna di 55 anni con leucemia linfocitica acuta con infezione da virus varicella-zoster (VZV). L'essudato pleurale contiene numerose cellule mesoteliali con inclusioni nucleari ed inoltre alcune cellule giganti multinucleate. Con il microscopio elettronico si evidenziano, in alcune cellule mesoteliali, particelle virali intranucleari di circa 150 nm di diametro. La paziente presenta anche vescicole cutanee. A livello autoptico cellule infettate dal VZV vengono isolate nella pelle, nei polmoni, nella pleura, nel fegato, nel pancreas, nei reni e nel tratto gastrointestinale.

Yasuda A, Kimura H, Hayakawa M, Ohshiro M, Kato Y, Matsuura O, Suzuki C, Morishima T. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatrics*. 2003 Jun; 111:1333-6.

I neonati pretermine sono gravemente a rischio per infezioni perinatali da cytomegalovirus (CMV). Questo studio valuta la cinetica del CMV nel latte materno ed il rapporto di trasmissione postnatale di CMV con l'allattamento al seno dalla madre ai neonati pretermine. Sono stati esaminati 30 madri e relativi 43 neonati pretermine. Con un test di real-time PCR si è cercato il CMV nel latte materno, nel siero e nelle urine. 24 madri (80%) con 34 neonati pretermine presentavano immunoglobuline positive per il CMV; di

queste 21(87.5%) avevano il genoma virale nel latte materno con persistenza di positività fino a 2 settimane dopo il parto. Solo 3 neonati presentarono infezione da CMV.

Ball SC. Pulmonary hypertension and HIV. *AIDS Read*. 2003 May; 13(5):209-10,217-9.

Yarkin F, Chauvin S, Konomi N, Wang W, Mo R, Bauchm G, Diaz A, Burstein D, Szporn A, Hauptman E, Zhang DY. Detection of HPV DNA in cervical specimens collected in cytologic solution by ligation-dependent PCR. *Acta Cytol*. 2003 May-Jun; 47(3):450-6.

Zimmerman SA, Davis JS, Schultz WH, Ware RE. Subclinical parvovirus B19 infection in children with sickle anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003 May; 25(5):387-9.

La prevalenza dell'infezione sierologica da parvovirus B19 in bambini con anemia falciforme aumenta con l'età. Dai 4-5 ai 9 anni la percentuale di positività è del 53% mentre diventa del 71% dai 17 ai 21 anni. Solo il 27% di questi pazienti (in totale 102 esaminati) ha presentato crisi aplastiche transitorie.

Mackie PL. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr Respir Rev*. 2003 Jun; 4(2):84-90.

Dopo un boom della virologia respiratoria negli anni 1960 con l'avvento dei rhinoviruses, coronaviruses, enteroviruses, adenoviruses, parainfluenza viruses e virus respiratorio sinciziale si è pensato ad un aggiornamento dei patogeni (compresi i più recenti) associati con le infezioni dell'apparato respiratorio. La lista comprende più di 200 virus antigenicamente distinti divisi in diversi gruppi.

Nowak DA, Boehmer R, Fuchs HH. A retrospective clinical, laboratory and outcome analysis in 43 cases of acute aseptic meningitis. *Eur J Neurol*. 2003 May; 10(3):271-80.

Sono stati analizzati in uno studio retrospettivo 43 casi di meningite acuta asettica (AAM) avvenuti in 24 mesi. Di questi casi 19 (44%) erano dovuti ad enterovirus, 1 (2%) ad HIV, 2 (5%) al virus Varicella-zoster, 3 (7%) al virus herpes simplex 1, 2 (5%) al virus herpes simplex 2, 1 (2%) al virus encefalitico Central European ed in 15 pazienti l'eziologia permaneva sconosciuta. I sintomi maggiormente presenti erano emicrania (100%) e febbre (93%). La risoluzione clinica era stata ottimale nel 40% dei casi e senza complicazioni particolari nel 51%.

Gisselquist D, Potterat JJ. Uncontrolled herpes simplex virus-2 as a cofactor in HIV transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 May 1; 33(1): 119-20.

Aggiornamenti sulle legionellosi dal Convegno EWGLI 2003.

Laura Franzin

Sezione Malattie Infettive, Università di Torino - Ospedale Amedeo di Savoia. ASL3 Torino.

E-mail: franzin@asl3.to.it

Nel maggio 2003 si è svolto a Bellinzona il Convegno Annuale dell'European Working Group on *Legionella* Infections (**EWGLI**). Questo gruppo di studio è stato costituito nel 1986 da alcuni epidemiologi e microbiologi europei allo scopo di promuovere studi collaborativi sulle Legionellosi e sui loro agenti eziologici. L'attività di EWGLI ha portato alla realizzazione di un convegno scientifico annuale ed alla costituzione di un sistema di sorveglianza per rilevare i casi di legionellosi (LD) nei turisti. Lo schema, istituito nel 1987, era inizialmente coordinato dallo Swedish Institute for Infectious Disease Control, National Bacteriology Laboratory di Stoccolma e finanziato dall'OMS. Dal 1993 il sistema di sorveglianza, è coordinato dal PHLS (Communicable Disease Surveillance Centre) di Londra ed è finanziato dalla Commissione Europea. A questo sistema di sorveglianza, denominato **EWGLI-NET** dal luglio 2002, hanno aderito centri appartenenti a 36 nazioni europee, inclusa l'Italia (4).

La legionellosi è una malattia infettiva sottoposta a notifica obbligatoria in molti paesi europei, ma solo alcuni hanno sviluppato uno schema di sorveglianza nazionale. Perciò le statistiche EWGLI non comprendono tutti i casi di LD dei turisti europei. In Italia la legionellosi è sottoposta ad obbligo di notifica dal 1983 (DM 07.02.83) nelle malattie di classe II. Esiste anche un sistema di sorveglianza ed un Registro Nazionale delle Legionellosi presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Nello schema di sorveglianza europea, un caso è considerato associato ai viaggi se il paziente ha pernottato una o più notti in luoghi diversi dall'abitazione abituale (es. alberghi, appartamenti, campeggi, ecc.) nei 10 giorni precedenti la comparsa dei sintomi, ma questo non implica necessariamente che il luogo di soggiorno sia la sorgente d'infezione (4).

La definizione di caso per la notifica internazionale di legionellosi associata ai viaggi (4) deve soddisfare 3 criteri: 1- criterio clinico: i casi devono avere una diagnosi clinica o radiologica di polmonite; 2- evidenza microbiologica: i casi devono avere una diagnosi di laboratorio confermata o presuntiva. La diagnosi di laboratorio è considerata confermata: a) dalla coltura positiva (isolamento di *Legionella* spp. da campioni respiratori, tessuto polmonare o sangue); b) dalla sieroconversione (aumento di almeno quattro volte il titolo anticorpale contro *L. pneumophila* sierogruppo 1 mediante immunofluorescenza indiretta o microagglutinazione); c) dalla rilevazione dell'antigene urinario (rilevazione di antigene specifico nelle urine usando reagenti validati). La diagnosi è considerata presuntiva: a) dalla sierologia che presenta aumento di almeno quattro volte il titolo contro altri sierogruppi di *L. pneumophila* o di altre specie mediante immunofluorescenza indiretta o microagglutinazione; b) dalla sierologia con un singolo titolo anticorpale elevato, usando reagenti contro *L. pneumophila* di sierogruppo 1 o altre specie e sierogruppi;

c) dalla rilevazione dell'antigene specifico nei campioni respiratori o colorazione immunofluorescenza diretta nei campioni respiratori o nel tessuto polmonare con anticorpi monoclonali; d) dalla rilevazione del DNA di *Legionella* spp mediante PCR. 3- storia di viaggio: il paziente deve aver pernottato una o più notti in luoghi diversi dalla abitazione abituale nel paese di residenza o all'estero nei 10 giorni precedenti la comparsa dei sintomi. La comparsa dei sintomi di LD deve avvenire entro dieci giorni dall'ultima data del viaggio (4).

Le linee guida europee sulla legionellosi.

EWGLI ha emanato le linee guida sulla Legionellosi "**European guidelines for control and prevention of travel associated legionnaires' disease**" (4) (alla cui stesura ha partecipato anche la Dottoressa Maddalena Castellani Pastoris dell'ISS) che sono diventate operative nel luglio 2002 ed alle quali hanno aderito al momento 23 nazioni. Il 2 giugno 2003 una edizione aggiornata è stata approvata come documento ufficiale dalla Commissione "Epidemiological Surveillance and Control of Communicable Diseases" dell'Unione Europea.

Dal 1 gennaio 2001 la definizione di "cluster" è la seguente: due o più casi che abbiano soggiornato presso la stessa struttura ricettiva e che si verificano in un periodo di 24 mesi. L'adozione di questa nuova definizione ha portato ad una sostanziale modifica nella suddivisione dei casi riportati come cluster e costituisce un elemento cardine su cui si basa lo schema di sorveglianza riportato nelle linee guida europee per il controllo delle legionellosi (4).

Il sistema prevede il seguente flusso. Le nazioni aderenti allo schema segnalano i casi di LD dei turisti che hanno acquisito l'infezione dopo viaggio all'estero. Il centro coordinatore di Londra verifica in base ai dati delle notifiche a disposizione se trattasi di cluster. In questo caso, il centro coordinatore segnala il caso al centro collaboratore (ISS in Italia) della nazione d'infezione. Questo centro deve far sì che la struttura ricettiva venga immediatamente ispezionata per evidenziare problemi tecnici che possono essere associati all'infezione e in parallelo devono essere immediatamente prese misure di controllo per assicurare la riduzione al minimo del rischio di legionellosi. Entro 2 settimane dalla notifica del caso il centro collaboratore EWGLI deve inviare una relazione preliminare al centro di coordinamento di Londra. Dopo 6 settimane dalla notifica deve essere inviata a Londra una relazione completa con i risultati microbiologici dei prelievi ambientali e la descrizione dettagliata delle misure di bonifica intraprese. Qualora le scadenze non vengano rispettate, i nomi degli alberghi inadempienti vengono pubblicati in un sito web accessibile al pubblico (4).

EWGLI ha anche sviluppato uno **schema di tipizza-**

zione molecolare dei ceppi, con un archivio di dati che consente di confrontare i profili AFLP ottenuti nel proprio laboratorio con protocollo EWGLI AFLP con quelli dei ceppi standard EWGLI AFLP (4). Infine ha predisposto un sistema di controllo di qualità esterno per la ricerca di *Legionella* dall'acqua **EQA water scheme** (4).

Convegno EWGLI 2003.

Nel Convegno sono stati esaminati diversi aspetti delle legionellosi riguardanti soprattutto epidemiologia, microbiologia, tipizzazioni molecolari dei ceppi e controllo di qualità.

Aspetti epidemiologici.

Sono stati presentati i dati delle legionellosi segnalate in Europa: circa 4700 casi nel 2002, circa 3500 nel 2001, contro 1242 casi riportati nel 1993. Si è osservato un progressivo aumento del numero dei casi, soprattutto di quelli associati ai turisti, in parte dovuto al miglioramento della rete epidemiologica (9). Il maggior numero dei casi di legionellosi associati ai viaggi è stato osservato dopo il soggiorno in Paesi dell'area mediterranea, anche se sovente la diagnosi è fatta nel paese di residenza del turista. La Spagna in genere è al primo posto, ma nel 2002 il primato è stato raggiunto per la seconda volta dall'Italia con il più alto numero di casi singoli (C. Joseph).

Si è osservato un aumento progressivo nel tempo del tasso di incidenza della malattia; mentre per alcune nazioni il numero dei casi è costante nel tempo, per altri come Italia, Francia e Spagna, si è assistito ad un incremento. Nel 2002 si è verificata la più grande epidemia inglese in Barrow in Furness (137 casi) (C. Joseph), associata ad una torre di raffreddamento non sottoposta ad alcun controllo o trattamento, localizzata in edifici comunali (3), mentre nel 2001 è stata descritta la più grande epidemia mondiale di LD (800 casi, di cui 449 confermati) in Murcia, Spagna (10). Nel 2001 i casi di Legionellosi in Italia sono stati 325, di cui 130 associati ai viaggi (74 turisti italiani, 56 stranieri) contro 177 e 66 rispettivamente nel 2000 (11,12). Molti casi non sarebbero stati riconosciuti senza EWGLINET.

L'impatto dell'applicazione delle linee guida europee (1 luglio 2002) è risultato positivo; il sistema di sorveglianza europeo ha portato alla segnalazione di un maggior numero di casi nel 2002 (671 casi di LD nei turisti) e all'esecuzione di un maggior numero di controlli ambientali nelle strutture ricettive rispetto agli anni precedenti (55 nel 2000, 140 nel 2001) (K. Ricketts) (9).

L'epidemia di LD in Olanda del 1999 (188 casi) associata ad una mostra floreale è stata oggetto di interessanti studi ed è stata presentata in dettaglio; da essa sono derivati importanti insegnamenti: 1- necessità di segnalazione rapida nel caso di epidemie e di tempestività operativa; 2- validità limitata dell'antigene urinario (sensibilità 40-53% nelle infezioni lievi, che quindi possono non venire diagnosticate se si utilizza solo questo test); 3- importanza fondamentale dell'isolamento colturale nel paziente, in quanto la disponibilità dei ceppi permette il confronto dei ceppi isolati dal paziente e dall'ambiente con le tipizzazioni molecolari e quindi riconoscere la sorgente d'infezione; 4- periodo di incubazione più lungo di 10 giorni nel 16% dei

casi; 5- persistenza di sequele piuttosto gravi nei pazienti dopo 17 mesi dalla malattia (P. Speelman) (3,8).

Nel corso del convegno è stata sottolineata l'importanza delle torri di raffreddamento dell'aria nelle epidemie di LD e un ruolo sempre più importante delle vasche per idromassaggio (J. Lee).

Aspetti microbiologici e diagnosi di laboratorio.

Sono stati presentati alcuni studi interessanti: rivelazione di *Legionella* dall'acqua mediante citometria in fase solida (H. Aurell) e ricerca diretta dai campioni biologici con Real-time PCR (J. Bangsberg) e con BD Probe Tec ET (S. Uldum). È stato presentato uno nuovo schema di tipizzazione dei ceppi con anticorpi monoclonali che si avvale di 12 reagenti (J. Helbig), utilizzato con ottimi risultati sui ceppi provenienti da un precedente studio Pan-Europeo. In quest'ultimo è stato dimostrato che la sensibilità dell'antigene urinario per i casi dovuti a ceppi MAb 3/1-positivi è 96%, quella per i negativi è < 71% e per i ceppi *L. pneumophila* non sierogruppo 1 è $\geq 33\%$ (6).

È da sottolineare la tendenza all'uso sempre maggiore dell'antigene urinario solubile come unico metodo diagnostico. Il solo utilizzo di questo test fa sì che polmoniti, dovute a specie e sierogruppi non riconosciute dal test non vengano diagnosticate, soprattutto in ospedale. Occorre non dimenticare che il "gold standard" rimane l'esame colturale.

In uno interessante studio sono stati esaminati ceppi con lo stesso profilo genomico con elettroforesi in campo pulsato, ma con differenti reattività agli anticorpi monoclonali; questi ceppi negativi con MAb 3/1 presentavano cambiamenti genetici sul locus *laf-1*; queste variazioni possono essere rilevanti nelle indagini epidemiologiche (C. Lück) (1).

Tipizzazioni molecolari dei ceppi.

EWGLI ha sviluppato un sistema di tipizzazione molecolare standardizzato AFLP, robusto e riproducibile (5). In seguito alla modifica di un prodotto commerciale per PCR occorre riesaminare i profili dei ceppi standard EWGLI (B. Afshar, N. Fry, T. Harrison). È in fase di studio lo sviluppo di un metodo di tipizzazione molecolare standardizzato basato sul sequenziamento genico per il quale si è costituito un gruppo di studio (V. Gaia, N. Fry, T. Harrison, C. Lück, J. Etienne). Nel convegno sono stati presentati diversi lavori sulla tipizzazione di ceppi di *Legionella pneumophila* di sierogruppo 1 e di altri sierogruppi con AFLP (Baladrón B). Il contributo del nostro laboratorio riguardava l'applicazione delle tecniche di tipizzazione molecolare in un caso di LD associato ad un club sportivo e la nostra esperienza sulla ricerca di *Legionella* dall'aria.

In conclusione, nonostante il progresso delle conoscenze scientifiche sulle legionellosi e l'attenzione posta negli ultimi anni alle misure di controllo e di prevenzione, il numero totale dei casi è in aumento. Negli ultimi anni inoltre si sono anche verificate quattro grandi epidemie: in Olanda (1999) (3,8), in Australia (2000) (119 casi) (13) e in Inghilterra (2002) (2), le più grandi per queste nazioni, e in Spagna (2001) (10), la più grande nel mondo. Le ultime tre in ordine cronologico sono associate alle torri di raffreddamento d'impianti di condizionamento dell'aria. Questi episodi ci ricordano regolarmente che la mancata applicazione

delle misure di controllo e di prevenzione hanno conseguenze catastrofiche per molte persone (7). La legionellosi rimane comunque una malattia sottostimata, soprattutto per i casi sporadici. Per questi motivi sarebbe auspicabile il massimo impegno anche in Italia nell'applicazione delle Linee guida europee EWGLI per il controllo e la prevenzione della legionellosi associate ai viaggi (4); si ricorda che le procedure di valutazione del rischio e la guida tecnica possono essere applicate a tutte le strutture. La legionellosi rimane una malattia di difficile diagnosi clinica e di laboratorio; per sconfiggerla occorre la cooperazione attiva di tutte le figure professionali coinvolte in maniera multidisciplinare, sia a livello locale che internazionale. Informazioni sull'attività di EWGLI si possono trovare nel sito www.ewgli.org.

BIBLIOGRAFIA

1. Bernander S, Jacobson K, Helbig JH et al. A hospital-associated outbreak of legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1 is characterized by stable genetic fingerprinting but variable monoclonal antibody patterns. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2503-8.
2. Calvert N. Legionnaires' disease outbreak in England – update. *Eurosurveillance Weekly* 2002; 33 (6).
3. Den Boer JW, Yzerman EPF, Schellekens J, et al. A large outbreak of legionnaires' disease at a flower show, The Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 37-43.
4. EWGLI: www.ewgli.org.
5. Fry NK, Bangsberg JM, Bergmans A et al. Designation of the European Working Group on Legionella Infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 722-8.
6. Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, et al. Pan-European study on culture-proven legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 710-6.
7. Joseph CA. New outbreak of legionnaires' disease in the United Kingdom. *Br Med J* 2002; 325: 347-8.
8. Lettinga KD. An outbreak of Legionnaires' disease at a flower show: clinical findings and studies on host defence mechanisms. Thela Thesis, Amsterdam, 2003.
9. Lever F, Joseph CA on behalf of EWGLI. Travel associated legionnaires' disease in Europe in 2000 and 2001. *Eurosurveillance* 2003; 8(3): 65-72.
10. Navarro C, Garcia-Fulgueiras A, Kool J, et al. Update on the outbreak of legionnaires' disease in Murcia, Spain. *Eurosurveillance Weekly* 2001; 5(29): 010719.
11. Rota MC, Castellani Pastoris M, Salmaso S. Rapporto annuale sulle legionellosi in Italia nel 2000. *Notiziario ISS* 2001; 14 (9).
12. Rota MC, Castellani Pastoris M, Salmaso S. Rapporto annuale sulle legionellosi in Italia nel 2001. *Notiziario ISS* 2002; 15 (10).
13. Tallis G, Greig B, Zwolak B, et al. A descriptive analysis of the Melbourne aquarium outbreak of legionnaires' disease. 5th International Conference on *Legionella*, Ulm, Germany, 2000, p.20.