

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

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

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

CP.6

DIAGNOSTICA DELLE GASTROENTERITI VIRALI

Cermelli C.

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

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

CP.7

LA DIAGNOSTICA PARASSITOLOGICA

Orsi A.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CP.8

ESPERIENZA DIAGNOSTICA ED ASPETTI EPIDEMIOLOGICI IN UNA GROSSA REALTÀ OSPEDALIERA

Pecile P., Fontanelli A.

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

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

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

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

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

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