

dovrà ricevere dalla Direzione strategica un chiaro mandato operativo. Dovranno essere definiti con precisione, nell'ambito dei programmi di prevenzione e controllo delle I.O., l'**organizzazione di una struttura operativa** ( Gruppo operativo o Servizio dotato di propria autonomia) con dettaglio degli obiettivi, personale dedicato/coivolto, strumenti ed un **sistema di sorveglianza** (dal laboratorio di Microbiologia) definendo cosa, come e chi sorvegliare, un sistema di allerta rapido (microorganismi sentinella e relative procedure).

La procedura di definizione di un'epidemia dovrà essere condivisa e dovrà prevedere le specifiche azioni da porre in essere e le autorità che dovranno disporle. Dovranno essere previste le ricadute delle singole azioni (es. costi di sanificazioni straordinarie, assegnazioni straordinarie di personale, variazioni di percorsi interni, contatti con i mass-media ecc.).

Gli interventi in caso di epidemia nosocomiale possono essere così riassunti: identificazione dell'epidemia, definizione di pseudo-epidemia, definizione di caso e verifica dei dati, definizione di focolaio epidemico, individuazione delle cause, protocolli di intervento.

---

## S1.4

---

### L'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE: METODI E LIMITI

**Dicuzono G.**

*Servizio Microbiologia, Campus Biomedico, Roma*

Il sospetto di un'epidemia in atto in un ospedale richiede tra le altre misure la raccolta dei ceppi incriminati e la dimostrazione che questi costituiscono effettivamente un "clone".

Preliminarmente occorre che i ceppi della specie incriminata vengano effettivamente identificati, in genere con metodi fenotipici, come appartenenti alla specie di interesse.

Per i batteri, d'altra parte, una "specie" è stata definita sulla base di una forma primitiva di genotipizzazione, in quanto si dice che ceppi appartengano alla stessa specie quando abbiamo un valore di omologia DNA-DNA <sup>3</sup> 70%.

E' stato sottolineato che occorre usare sia multipli metodi fenotipici affermati che esplorino varie caratteristiche metaboliche, antigeniche, morfologiche, biochimiche della specie, sia anche metodi che esplorino alcune caratteristiche dei genomi, per definire in maniera accettabile le specie in ambito batteriologico. Si va quindi affermando il concetto di un approccio multifasico alla stessa definizione delle specie. Questo atteggiamento era stato preceduto dalla tassonomia numerica, che può riavere un ruolo sempre più importante per correlare caratteristiche fenotipiche e caratte-

ristiche genomiche, specie con le disponibilità computazionali, anche a livello di desktop, che si possono ottenere con i moderni hardware dei computer da tavolo con varie piattaforme (Windows, Macintosh, Linux, UNIX).

L'epidemia o l'endemia in atto vengono definite solo quando i ceppi della stessa specie isolati in vari individui (malati o portatori sani) in vari tempi si rivelano appartenere allo stesso "clone".- E' quindi cruciale definire un "clone".

Un clone od un gruppo clonale di isolati ( o ceppi) è compreso dai ceppi che discendono da un ceppo comune originante (common ancestor).

A questo punto è necessaria una definizione operativa di clone ( o cloni appartenenti allo stesso gruppo clonale): esso richiede una definizione di parentela adeguatamente dimostrata attraverso tecniche le quali usino dei markers genetici di sufficiente potere discriminatorio.

Non esiste una metodica che possa essere definita come sufficientemente discriminatoria nei confronti di tutte le specie di interesse (clinico o epidemiologico o tassonomico).

E' necessario inoltre prendere in considerazione anche la semplicità d'uso della metodica, la sua riproducibilità intra ed interlaboratori, la sua portabilità(usabilità tra vari laboratori e trasmissione dei dati da laboratori a laboratori con metodi web-based).

Inoltre altro è identificare cloni a larga diffusione geografica che servono a disegnare il percorso nel tempo e nello spazio di determinati cloni (per esempio i cloni MRSA), od anche a definire gli avvenimenti di particolari fenomeni che hanno dato luogo al passaggio di materiale genetico importante ( per esempio il timing del passaggio di SSC, la cassetta contenente il gene di resistenza alla meticillina, dal supposto stafilococco coagulasi negativo resistente al primo *S. aureus*, ed i passaggi o perdite successive). Altro è invece identificare l'evolversi di un ceppo in un'epidemia ospedaliera, in cui occorre avvalersi di markers che rivelino anche sottili eventi evolutivi del ceppo.

Quindi non si possono dare consigli generali, anche se è certo che il primo vero metodo per la definizione di cloni, la Multilocus Enzyme Electrophoresis di Selander rimane una pietra miliare e rimane insuperata se non dalla sua versione genomica attuale proposta da alcuni anni dal gruppo di Spratt, cioè la Multi Locus Sequence Typing : queste due metodiche sembrano costituiscano ormai metodi di riferimento insostituibili nella definizione dei cloni a larga diffusione geografica o temporale.

La Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ha una lunga ed onorata storia d'uso e larghi meriti nella definizione di cloni sia di Gram positivi che di Gram negativi: essa soffre di una notevole difficoltà di riproducibilità e portabilità, solo in parte risolta da metodi di rilevamento e digitalizzazione automatici, nonché dall'uso di algoritmi di calcolo delle relazioni tra ceppi,

com'è in diversi softwares come il Bionumerics ed altri.

I metodi basati sulla PCR, che sarebbe troppo lungo elencare in una presentazione riassunta sono molto attraenti perché in linea di principio più semplici dei precedenti e portabili: in genere ognuno ha i suoi meriti ed in genere alcuni si adattano meglio ad alcune specie e non ad altre.

Molto dipende dal tipo di target dei primers, ed alcuni anche dalla complessità degli adattatori che si usano.

Si può pensare che il metodo ideale dovrebbe avere dei target particolari con zone ripetitive, al prodotto della cui amplificazione si possa applicare metodiche di sequenziamento o di restrizione che permettono una identificazione univoca del clone.

Il più delle volte occorre unire PFGE e PCR per vari target sottoposti a sequenziamento o restrizione per ottenere con un metodo a cascata un sistema esauriente, ma anche il più economico possibile, di identificazione di un clone.

## S1.5

### ESPERIENZE NELLA GESTIONE DI EPIDEMIE NOSOCOMIALI: OSPEDALE S. G. BATTISTA DI TORINO

Serra R., Fossati L., Marchiaro G.

SCDO Microbiologia ASO S.G. Battista - Torino

Gli eventi epidemici, in ospedale, pur riconoscendo diverse concause (multifattorialità, comune agli eventi infettivi di carattere nosocomiale) sono per lo più sostenuti da un unico agente eziologico; in qualche caso tuttavia vi può essere pluralità di agenti eziologici (es. infezioni della ferita chirurgica o delle vie urinarie associate a cateterismo vescicale sostenute da microrganismi diversi, quale espressione di gravi carenze sul piano igienico-assistenziale). Inoltre tali eventi possono non essere percepiti come clinicamente manifesti, bensì presentarsi sotto forma di colonizzazione o sieroconversione, entrambe silenti.

Viene riportata l'esperienza del Servizio di Sorveglianza Microbiologica delle Infezioni (SSMI) che fa capo alla SCDO Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino in tema di sorveglianza e controllo delle epidemie maturata in un grande ospedale regionale di circa 1400 posti letto, con oltre 35.000 ricoveri anno, sede di istituti universitari, di unità di trapianto di organi e centro di rilevanza nazionale per il case mix. Gli eventi epidemici osservati sono in gran parte riconducibili a quattro tipologie principali.

Eventi che hanno ormai da tempo assunto un carattere endemico, ma che sporadicamente manifestano rilievo epidemico.

Le infezioni sostenute da MRSA sono tradizionalmente prevalenti nelle unità di terapia intensiva, in cui la percentuale di pazienti colonizzati è costantemente elevata e rappresenta il serbatoio più rilevante di infezioni, veicolate per lo più dalle mani del personale. Il SSMI ha messo a punto un dispositivo di sorveglianza basato sulla rilevazione sistematica del numero di eventi (pazienti con almeno un isolamento di ceppi MRSA da campioni ritenuti rappresentativi): la segnalazione di possibile evento epidemico viene comunicata al personale addetto al controllo delle infezioni (ICI) quando il numero di casi registrati nella frame temporale considerata (settimana corrente) è significativamente superiore al valore medio calcolato per quella frame, continuamente aggiornato e rilevato su un periodo storico di dodici mesi.

Il controllo dell'endemia è da sempre problematico per la scarsa compliance del personale a rispettare le misure di barriera più efficaci, complici le croniche carenze dell'organico e delle strutture, che non consentono efficaci misure di isolamento, oltre alla pressione selettiva dovuta all'impiego massiccio di antibiotici. È stata avviata di recente un'esperienza pilota in due unità di terapia intensiva che prevede lo screening per MRSA dei pazienti all'ingresso, l'isolamento contumacia, l'eventuale bonifica con mupirocina, e colture di sorveglianza settimanali dei ricoverati.

Eventi epidemici di origine esclusivamente ambientale. Si tratta di infezioni sostenute da patogeni non trasmissibili mediante contagio interumano, ma che possono coinvolgere aree più o meno vaste dell'ospedale in relazione al grado di contaminazione ambientale. Gli episodi di legionellosi che pochi anni prima hanno fatto registrare una incidenza relativamente elevata, sono stati efficacemente (anche se non del tutto) controllati mediante clorazione continua della rete idrica; il livello di sorveglianza viene tuttavia mantenuto elevato (ricerca sistematica dell'antigene urinario in tutti i casi di polmonite).

Attualmente trascurabile, anche nei reparti a rischio, il numero di casi di aspergillosi invasiva, probabilmente per effetto delle rigorose (e costose) misure di prevenzione adottate nei numerosi cantieri, sempre aperti in un ospedale che ha più di 60 anni, e della movimentazione dei pazienti.

È stata di recente osservata una epidemia di sepsi da contaminazione di soluzioni per infusione parenterale: l'evento è stato tempestivamente riconosciuto data anche la relativa rarità dell'agente eziologico identificato (*R. pickettii*).

Il riscontro del medesimo ceppo in emocolture di pazienti ricoverati in reparti diversi dell'ospedale, in un primo tempo è stato attribuito a contaminazione dei dispositivi per emocoltura (evento pseudoepidemico già segnalato in letteratura); esclusa tale eventualità, l'indagine epidemiologica ha in seguito ipotizzato la possibile sorgente dell'infezioni in una partita di fiale di eparina somministrata ai pazienti: anche se colture