

relazioni

SESSIONE 2

Tipizzazione Batterica

Mercoledì 15 ottobre 2003, 9.00-13.00 Sala Giotto
Palazzo Affari - 3° piano

S2.2

ANALISI E VALIDAZIONE DEI RISULTATI NELLE INDAGINI DI EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE

Carretto E., Barbarini D., Marone P.

*Laboratori Sperimentali di Ricerca, Area Infettivologica,
IRCCS Policlinico "San Matteo", Pavia*

Un nuovo impulso alla tipizzazione microbica si è avuto con l'estesa applicazione in questo ambito delle tecniche di biologia molecolare. Variabili nella tipologia, nessuna di esse ha caratteristiche di universalità (cioè funziona bene per la totalità delle specie microbiche), e la maggior parte non è sufficientemente standardizzata. L'utilizzo di una tecnica molecolare a fini di tipizzazione non può prescindere dall'adeguata conoscenza dei suoi criteri interpretativi, variabili a seconda delle metodiche. Linee guida sono state proposte, ad esempio, per l'interpretazione di patterns ottenuti con la PFGE, con la ribotipizzazione e con l'amplificazione con primers arbitrari (RAPD). Nel caso della PFGE si sono correlate le variazioni geniche di singoli isolati con il numero di bande risultanti, proponendo quindi la definizione dei ceppi come clonali, strettamente correlati, possibilmente correlati e non correlati: ceppi sicuramente non correlati devono possedere almeno sette bande di differenza nei loro profili. Nel caso della ribotipizzazione due profili sono invece considerati appartenere a cloni distinti quando differiscono per almeno una banda netta. E' più difficile fornire criteri interpretativi per profili ottenuti con i RAPD: tentativi di standardizzazione per analisi eseguite con primers conservati (ERIC1 e ERIC2) sembrano indicare una non clonalità per profili che differiscono per almeno tre bande, ma è intrinseca al metodo la possibilità di utilizzare primers scelti a caso e, inoltre, con questa metodica è frequente il riscontro di

bande di intensità differente di difficile interpretazione. Dagli esempi è evidente come ogni tecnica abbia criteri interpretativi sostanzialmente differenti. Un ausilio può essere fornito dall'utilizzo di software dedicati all'analisi e all'interpretazione dei dati, ma in ogni caso i risultati proposti devono sempre essere validati dall'esperienza dell'operatore. Infine, qualora eseguano indagini per valutare sospetti outbreak nosocomiali, i dati ottenuti con tecniche molecolari devono essere sempre integrati e verificati con il dato clinico-epidemiologico. Senza quest'ultimo, l'universo dell'epidemiologia molecolare rischia di essere un "universo parallelo" dal quale è difficile desumere alcun tipo di informazione.

S2.3

IMPORTANZA DELLA TIPIZZAZIONE BATTERICA NELLO STUDIO DELLE INFEZIONI NOSOCOMIALI

Fossati L., Ravotto M.

SC Microbiologia, AO San Giovanni Battista Torino

Le infezioni nosocomiali insorgono durante la degenza in ospedale, non sono clinicamente presenti né in incubazione al momento del ricovero e alcune possono manifestarsi anche dopo la dimissione (ad es., in particolare le infezioni della ferita chirurgica).

I batteri Gram negativi rappresentano i patogeni maggiormente rappresentati, anche se negli ultimi anni è aumentato il riscontro di batteri Gram positivi (stafilococchi, enterococchi) e di miceti (Candida).

In caso di aumento della frequenza di isolamento di potenziali patogeni in una data area dell'ospedale accompagnata dal riscontro di nuovi casi di infezione, è necessario avviare un'indagine epidemiologica per identificare le cause dell'epidemia e individuare i punti

critici della catena di trasmissione: contatto diretto, da soggetto infetto ad un altro non infetto o attraverso droplets; contatto indiretto, attraverso le mani del personale e/o da veicoli quali sangue, liquidi d'infusione, farmaci, disinfettanti, e tutte le altre modalità di trasmissione da fomite ambientali (aspergilloso, legionellosi).

Nell'ambito dell'indagine epidemiologica, deve essere costituito un gruppo di lavoro ad hoc che svolge una sorveglianza diretta nel reparto, basata sulla raccolta sistematica dei dati relativi ai casi di infezione e sulla revisione delle procedure assistenziali. E' indispensabile infine, sulla scorta dei dati epidemiologici, procedere alla tipizzazione dei microrganismi coinvolti per valutare se l'eventuale epidemia riconosce una origine comune ambientale o se è da attribuire a trasmissione interumana, in cui il paziente stesso colonizzato o infetto funge da serbatoio dell'infezione. Le tecniche di tipizzazione molecolare permettono di stabilire l'identità o la correlazione clonale di ceppi batterici, di ricercare il pattern di trasmissione dei cloni e gli eventuali serbatoi, e inoltre di stabilire la potenziale efficacia delle misure di controllo adottate. Negli ultimi anni lo sviluppo di metodiche molecolari basate sullo studio del polimorfismo genetico ha fornito un notevole contributo allo studio epidemiologico delle infezioni. Tali tecniche devono soddisfare determinate caratteristiche quali la riproducibilità, la stabilità, il potere discriminatorio, la concordanza epidemiologica, la rapidità di esecuzione e la facilità di interpretazione dei risultati. Tra i metodi di confronto più utilizzati vi sono quelli che si basano sull'analisi dei polimorfismi di restrizione del genoma batterico sia mediante PFGE, sia mediante Southern blot. Quest'ultimo risulta essere moderatamente discriminante, ma molto riproducibile e stabile.

L'analisi elettroforetica dei pattern di restrizione mediante PFGE rappresenta il gold standard per la tipizzazione di molti microrganismi patogeni. Questa tecnica risulta avere un elevato potere discriminatorio, ma prevede tempi di esecuzione maggiori rispetto ad altre analisi. La versatilità e la sensibilità della metodica nel rilevare riarrangiamenti genomici minimi permette di interpretare correttamente gli episodi epidemici e di essere utilizzata negli studi di sorveglianza: un profilo identico permette di ipotizzare la clonalità del ceppo mentre problemi di interpretazione si possono avere in caso di profili simili ma non identici.

La ribotipizzazione mediante utilizzo di strumenti completamente automatizzati (Riboprinter) presenta caratteristiche di alta riproducibilità, stabilità e un discreto potere discriminatorio, poiché gli operoni ribosomiali rappresentano solo lo 0.1% dell'intero cromosoma batterico. Altre tecniche di tipizzazione (RAPD) prevedono l'amplificazione di sequenze arbitrarie con l'utilizzo di primers non specifici e condizioni di bassa stringenza.

Nel nostro laboratorio viene effettuata una sorveglian-

za quotidiana nei confronti dei principali microrganismi sentinella (MRSA, VRE, P.aeruginosa MDR, enterobatteri produttori di ESBL, C. difficile, Legionella, Aspergillus e altri): in caso di rilevazione di un cluster epidemico, vengono tipizzati i microrganismi coinvolti mediante le tecniche della PFGE (VRE e MRSA), Riboprinter (P.aeruginosa, Enterobatteriacee e S.maltophilia) e RAPD (MRSA).

S2.4

LA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE COME RAFFORZAMENTO DELLA SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI DA SALMONELLA - IL PROGETTO EUROPEO SALMGENE

Luzzi I., Filetici E., Dionisi AM., Scalfaro C.

Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299 Roma

Nei Paesi industrializzati Salmonella è un patogeno zoonotico che riconosce nel pollame, nei bovini e nei suini il principale serbatoio animale e negli alimenti di origine animale i principali veicoli di trasmissione all'uomo. Il commercio internazionale di animali e alimenti, ampiamente diffuso in Europa, rende possibile la comparsa di episodi epidemici a livello internazionale.

La prevenzione e il controllo delle salmonellosi dipende in larga misura da un valido sistema di sorveglianza basato sulla tipizzazione degli isolati batterici. I metodi universalmente accettati per la tipizzazione delle salmonelle sono rappresentati dalla sierotipizzazione e dalla fagotipizzazione in grado di discriminare all'interno dei sierotipi. Il valore di questi metodi fenotipici come strumento di sorveglianza è ben stabilito anche se, a causa della predominanza di alcuni sierotipi e fagotipi in molti Paesi, tecniche molecolari basate sul DNA devono essere utilizzate nelle investigazioni degli episodi epidemici quando è necessario aumentare la discriminazione tra i ceppi.

Tra i metodi molecolari l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) rappresenta il gold standard: è altamente discriminante e capace di suddividere gli isolati batterici correlati a situazioni epidemiche.

In Europa da anni è attivo in Europa un sistema di sorveglianza delle infezioni da Salmonella (Enternet) e nel 2002 è stato avviato un progetto finanziato dalla Comunità europea con l'obiettivo di valutare il valore aggiunto di una tipizzazione molecolare per il riconoscimento degli episodi epidemici. Il progetto, a cui partecipano 10 paesi europei tra cui l'Italia, ha come obiettivi primari quelli: i) di sviluppare procedure operative standard per l'esecuzione della PFGE e per il riconoscimento computerizzato dei risultati, ii) di crea-