

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-

re un archivio consultabile di profili elettroforetici dei principali sierotipi di Salmonella circolanti in Europa, iii) di tipizzare in tempo reale un gran numero di ceppi in ciascun Paese usando criteri di selezione che rendano massimo il potere di rilevazione degli episodi epidemici, iv) di analizzare continuamente i dati nell'archivio on line, infine v) di stabilire un controllo di qualità esterno per la PFGE.

I profili elettroforetici di circa 10000 ceppi di Salmonella responsabili di infezioni umane, appartenenti a diversi sierotipi e isolati in anni diversi, sono stati ottenuti nei diversi centri partecipanti al progetto ed inviati al centro di coordinamento presso l'HPA di Colindale, dove sono stati elaborati mediante un software dedicato (Bionumerics) ed inseriti in un archivio elettronico. I risultati finora ottenuti hanno permesso di classificare 1500 ceppi di *S. enteritidis* in 29 profili elettroforetici e 1300 ceppi di *S. typhimurium* in oltre 60 profili. L'analisi ha consentito inoltre di valutare la capacità discriminante della PFGE all'interno dei diversi tipi fagici e la distribuzione dei profili elettroforetici per area geografica.

I controlli di qualità esterni (che hanno luogo ogni 6 mesi) hanno mostrato che è possibile riprodurre i risultati a livello dei diversi centri partecipanti e di trasferire elettronicamente le informazioni ad un archivio centrale.

Per la tipizzazione in tempo reale, ceppi di recente isolamento e appartenenti ai sierotipi e fagotipi prevalenti, vengono tipizzati mediante PFGE nei diversi centri europei ed inviati settimanalmente insieme alle informazioni epidemiologiche al centro di coordinamento che provvede alla gestione del database europeo.

Il confronto dei profili elettroforetici di ceppi responsabili di focolai epidemici di salmonellosi nei diversi Paesi della UE, insieme ad altri dati di tipizzazione e alle informazioni epidemiologiche fornirà una solida base per l'introduzione di appropriate strategie di intervento.

S2.5

PNEUMOCOCCO MULTIRESISTENTE: LA TIPIZZAZIONE GENOTIPICA COME METODO TRACCIANTE I PRINCIPALI CLONI

Dicuonzo G., Pantosti A.

Università Campus Biomedico e Istituto Superiore di Sanità, Roma

Dalla fine degli anni 80 sono comparsi e si sono rapidamente diffusi ceppi di pneumococco che presentano resistenza alla penicillina e ad altri antibiotici, soprattutto ai macrolidi. La resistenza in pneumococco è generalmente dovuta a trasmissione orizzontale di

materiale genetico, per trasformazione o per coniugazione, mediante trasposoni coniugativi. Un ceppo resistente possiede caratteristiche vantaggiose per la sopravvivenza, per cui può essere selezionato positivamente nell'ambiente in cui si trova, e la sua progenie può espandersi dando origine ad un clone. Una caratteristica importante dei cloni multiresistenti è che la selezione può essere effettuata da uno solo degli antibiotici ai quali è resistente. Il riconoscimento dei cloni, delle loro caratteristiche e della loro diffusione è quindi estremamente importante per comprendere le dinamiche dell'antibiotico-resistenza in una determinata popolazione o area geografica. La tipizzazione fenotipica mediante il sierotipo capsulare rappresenta il dato di base per la descrizione di un clone; la sua utilità però è limitata in quanto uno stesso sierotipo può comprendere diversi cloni, e nell'ambito di un clone possono avvenire cambiamenti ("switch") capsulari. La tipizzazione genotipica, invece, basata su caratteristiche dell'intero genoma o sulla sequenza di geni particolari, è in grado di fornire in maniera univoca una "impronta digitale" del ceppo. Per il pneumococco il "gold standard" è rappresentato dai profili di macrorestrizione del DNA ottenuti mediante elettroforesi in campo pulsato, mediante i quali si ottiene un'ottima discriminazione tra i ceppi ed il confronto è relativamente facile. Recentemente è stata sviluppata una metodica basata sulle sequenze di 7 geni che codificano per alleli di enzimi metabolici denominata Multilocus Sequence Type (MLST). Grazie ad un programma accessibile in Internet (<http://spneumoniae.mlst.net>), è possibile attribuire un numero a ciascuna sequenza allelica di ciascun gene. Il profilo allelico del ceppo determina il sequence type (ST) e può essere confrontato con quello di ceppi isolati in diverse parti del mondo presenti nella banca dati del sito. Ad oggi vi sono più di 800 ST ottenuti dai ceppi esaminati. Sempre utilizzando gli strumenti del sito, è possibile costruire un albero filogenetico che tiene conto delle distanze tra i vari ceppi e suggerisce rapporti clonali ed evoluzione di cloni. Applicando questi metodi abbiamo studiato ceppi di pneumococco provenienti da malattie invasive isolati in varie aree geografiche italiane. Abbiamo accertato che nel nostro paese sono presenti ceppi appartenenti a cloni internazionali antibiotico-resistenti, che sono diffusi in molti paesi europei quale il clone penicillino-resistente France/Spain^{9V}-3, il clone penicillino-sensibile eritromicino-resistente England¹⁴-9, e un clone di sierotipo 6B penicillino-sensibile ma multiresistente diffuso in diversi paesi dell'area mediterranea. Abbiamo anche individuato nel nostro paese un clone originariamente apparso in Svezia come penicillino-sensibile e come sierotipo 15A (il clone Sweden^{15A}-25), che nel nostro paese è presente con ceppi intermedi alla penicillina e appartenenti sia al sierotipo 15A che con switch capsulare al sierotipo 19A. Infine, abbiamo individuato un clone nuovo, che non era stato descritto in precedenza, multiresistente ed appartenente ad un