

relazioni

SESSIONE 7

La Biologia Molecolare in microbiologia: stato dell'arte

Giovedì 21 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

S7.2

RUOLO DELLA AMPLIFICAZIONE DIRETTA NELLA DIAGNOSTICA DELLA TBC: VANTAGGI, LIMITI, COSTO-EFFICACIA

Piersimoni C.

*Gruppo di Studio Micobatteri AMCLI
E-mail: piersim@tin.it*

La diagnosi di laboratorio della Tuberculosis (TB) si può effettuare tramite i test di amplificazione diretta (DAT), anche se la loro sensibilità non raggiunge quella della coltura che rimane il "gold standard".

La positività dei DAT dipende dalla presenza del target (DNA o RNA) micobatterico nelle secrezioni respiratorie o dalla sua disseminazione nei liquidi biologici e/o nei prelievi bioptici.

Nei casi di malattia micobatterica bacillifera, la positività combinata di microscopia e DAT attesta una sicura diagnosi di tubercolosi attiva, mentre la positività microscopica associata con un DAT negativo in assenza di sostanze inibenti indica una malattia da micobatteri non tubercolari.

Il ruolo dei DAT diventa più importante in corso di TBC paucibacillare. In questo caso, purtroppo, alcune limitazioni delle tecniche attualmente in uso quali la insufficiente estrazione del target rendono la sensibilità dei DATs ancora troppo limitata specialmente nei campioni extrapulmonari.

Purtroppo, a fronte di prestazioni diagnostiche non straordinarie si registrano costi mediamente elevati almeno per quanto attiene ai kit commerciali che rappresentano i DAT di gran lunga più diffusi. Inoltre, i dati presenti in letteratura valutano questi test soprattutto dal punto di vista della performance analitica piuttosto che della reale utilità clinica.

E' necessario poter quantificare l'efficacia dei DAT ad

orientare l'iter diagnostico e la conseguente condotta terapeutica in diversi contesti clinici specialistici e non. Solo così sarà possibile valutarne la reale efficacia.

Nell'ambito della revisione delle metodologie diagnostiche per la TB attiva e latente, diventa fondamentale valutare la utilità clinica dei DAT in relazione alla stima della probabilità pre-test (sospetto clinico).

La successiva valutazione dei risultati alla luce della storia clinica e follow up dei singoli pazienti potrà consentire di predisporre una proposta di linee guida per il corretto utilizzo dei DAT in clinica.

S7.3

IL RUOLO DELLA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE NEL CONTROLLO DELLA TRASMISSIONE NOSOCOMIALE DELLE INFEZIONI VIRALI

Ghisetti V., Alice T.

*S.C. Microbiologia, Ospedale Molinette,
corso Bramante 88, 10126 Torino*

L'applicazione delle tecniche molecolari in ambito epidemiologico ha aperto il campo al controllo delle diffusione nosocomiale di importanti virus quali quelli delle epatiti B e C, HIV, i virus respiratori e gli agenti di gastroenteriti, che rappresentano un'ampia fonte di infezioni nosocomiali, rispetto a cui l'adozione delle Precauzioni Universali non sempre è sufficiente a contenerne la diffusione.

Data l'elevata variabilità genotipica e di quasispecies dei virus, dal punto di vista clinico ed epidemiologico è opportuno prevedere l'integrazione delle tecniche convenzionali con altre avanzate per rispondere all'esigenza di identificare e differenziare rapidamente virus responsabili di patologie simili e tracciarne la

catena epidemiologica di diffusione, per approntare misure di contenimento nei reparti ad alto rischio (ematologie, oncologie, emodialisi e trapianti), e di profilassi e terapia nei pazienti esposti.

A questi requisiti rispondono piattaforme molecolari multiple e rapide, per l'identificazione differenziale di agenti virali mentre le tecniche di sequenziamento associate a studi di filogenesi consentono la tipizzazione degli isolati e la definizione della catena epidemiologica di trasmissione.

Scopo.

Allestimento di un sistema multiplo di real-time-PCR-TaqMan per l'identificazione e tipizzazione dei virus dell'influenza A (FluA) e B (FluB) nell'ambito del controllo nosocomiale dell'influenza nei reparti di oncoematologia.

Materiali e metodi.

Durante le stagioni 2004-2005 e 2005-2006 sono stati analizzati 82 materiali provenienti dalle vie respiratorie superiori di 64 pazienti in attesa di trapianto allogenico di cellule staminali. I risultati in real-time-PCR sono stati confrontati con quelli in PCR convenzionale. I campioni positivi sono stati sequenziati sul gene HA per stabilire la presenza di un cluster epidemico.

Risultati.

Mediante real-time-PCR sono stati identificati 18 campioni positivi per FluA (22%) e 4 per FluB (5%), 12 in più di quelli identificati con le tecniche di PCR tradizionali. 14 FluA appartenevano al sottotipo H3N2, 2 a H1N1, e 2 non erano tipizzabili. In accordo con i dati stagionali, nel 2004-2005 sono risultati positivi 13/30 (43%) campioni di cui 11 FluA e 2 FluB, mentre nel 2005-2006 solo 9/52 (17,3%: 7 FluA e 2 FluB). L'analisi della sequenza del gene HA dei campioni positivi in entrambe le stagioni, suggerisce la presenza di un unico cluster caratterizzato da una distanza filogenetica inferiore al 1,2%. In entrambe le stagioni è stata effettuata una profilassi specifica dei contatti con amantadina mentre e nei pazienti sintomatici è stato utilizzato un breve ciclo di terapia con inibitori della neuraminidasi virale, che ha risolto l'infezione senza complicazioni.

Conclusione.

La piattaforma di real-time-PCR associata all'analisi di sequenza degli isolati influenzali, è risultato strumento accurato, rapido, sensibile e specifico fornendo informazioni importanti nell'ambito della sorveglianza della diffusione dell'influenza nei reparti ad alto rischio, consentendo di attuare una corretta e pronta strategia di profilassi e terapia dei pazienti.

S7.4

IL RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE NEL CONTROLLO DELLE INFEZIONI BATTERICHE NOSOCOMIALI E NELLA CARATTERIZZAZIONE DELLE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI

Carattoli A.

*Dipartimento di Malattie Infettive,
Parassitarie e Immuno-mediate,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Le infezioni ospedaliere sono sicuramente causa, oltre che di decesso, anche di invalidità temporanea o permanente. Per controllare e ridurre le infezioni ospedaliere è necessario che le strutture agiscano su più fronti, ma un protocollo di sorveglianza attiva delle infezioni che si manifestano e un appropriato flusso informativo, che permetta l'identificazione e la quantificazione delle infezioni stesse nei diversi presidi, è forse il punto fondamentale.

Uno dei fenomeni più preoccupanti dell'epidemiologia delle infezioni batteriche a livello mondiale è rappresentato dall'emergenza e dalla rapida disseminazione di microrganismi con resistenze ad antibiotici. I microrganismi più problematici da questo punto di vista sono gli enterococchi, gli stafilococchi meticillino-resistenti, i gram-negativi, la *Candida* e i micobatteri tubercolari multiresistenti.

I batteri possono sviluppare resistenza agli antibiotici mediante modificazioni del loro patrimonio genetico per mutazione, oppure mediante acquisizione di geni che conferiscono la resistenza. Quest'ultimo fenomeno è quello che maggiormente determina la rapida acquisizione e diffusione di resistenze ad uno o più antibiotici da parte dei batteri patogeni gram-negativi. L'acquisizione di resistenze mediante trasferimento orizzontale può avvenire anche tra batteri di specie diversa e rappresenta una rapida risposta adattativa dei batteri di fronte all'uso degli antibiotici. A livello nosocomiale il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è particolarmente veloce e a causa del largo uso di antibiotici, le popolazioni batteriche resistenti vengono rapidamente ed efficientemente selezionate rendendo problematico il trattamento terapeutico. Il controllo delle infezioni batteriche nosocomiali può essere affrontato mediante il monitoraggio delle popolazioni batteriche circolanti nell'ospedale, con particolare riferimento alla valutazione dell'incidenza e della prevalenza di ceppi resistenti ai farmaci di nuova generazione e più efficaci da un punto di vista clinico. La conoscenza dell'evoluzione della resistenza nei principali batteri patogeni, sia come studio della diffusione di particolari ceppi clonali, sia mediante studi molecolari dei geni