

relazioni

SESSIONE COMUNALE AMCLI-SIBioC

Il laboratorio nella diagnostica cardiologica

Venerdì 17 Ottobre 2003, Sala Michelangelo, Palazzo dei Congressi, piano -I

SC.1

PATOLOGIE CARDIACHE AD Eziologia infettiva: DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

Nicoletti P., Fabio U.

Le patologie cardiache infettive sono rappresentate, nella maggior parte dei casi, dalle endocarditi seguite da quelle, più rare, che colpiscono il miocardio ed il pericardio.

Endocarditi

Da un punto di vista della diagnosi eziologica le infezioni nelle quali il laboratorio di microbiologia clinica ha dato fino ad ora un più importante contributo al clinico sono sicuramente le endocarditi per la facilità di avere il materiale biologico adatto alle procedure diagnostiche. Nell'ambito di tali procedure (dirette, indirette, molecolari) l'indagine principalmente eseguita è il classico esame colturale dato il ruolo preminente, anche se non esclusivo, svolto dai batteri.

Anche se l'eziologia prevalente varia a seconda della situazione clinica di base (principalmente fra valvole native, protesi valvolari nel periodo precoce e tardivo, tossicodipendenti endovena, pazienti immunodepressi ecc.) ed a seconda dei fattori di rischio (infezioni vie urinarie, manovre sul cavo orale, neoplasie del colon, diabete mellito ecc.), nella maggior parte dei casi (intorno al 90-95%) queste infezioni sono sostenute da Streptococchi, Stafilococchi aurei e non aurei, bacilli gram-negativi e più raramente miceti.

In una piccola percentuale di casi (intorno al 5%) le endocarditi sono sostenute da microrganismi a lento o difficile sviluppo come ad esempio microrganismi del cosiddetto gruppo HACEK, *Bartonella sp.*, *Abiotrophia spp.* ecc. o addirittura non coltivabili con i previsti metodi tradizionali, come *Chlamydia sp.*, *Coxiella sp.*, *Borrelia sp.*, *Mycoplasma sp.*, *Legionella sp.*, Micobatteri ecc. Alcune di queste forme cliniche

sono indicate come "endocarditi ad emocoltura negativa".

Il principale test per la diagnosi microbiologica delle endocarditi è costituito dall'emocoltura che però deve essere effettuata modificando alcuni aspetti metodologici (principalmente allungando i tempi di incubazione ed eventualmente eseguendo sub-colture al termine dell'incubazione) sì da consentire lo sviluppo anche dei patogeni "difficili ed inusuali". Nei casi in cui con il metodo tradizionale non si rilevi sviluppo batterico è necessario ricorrere a metodi colturali speciali (terreni per Micobatteri, *Legionella sp.*, colture cellulari ecc.). Per i microrganismi non coltivabili o nel caso di sospette forme da Clamidia, Coxiella, Legionella, Borrelia e/o in quelle rarissime sostenute da virus Cocksackie si può ricorrere anche a test sierologici utilizzando le varie note metodiche (immunofluorescenza, elisa, fissazione del complemento ecc.). Attualmente sono già pronti o in sviluppo numerosi test di biologia molecolare per facilitare la diagnosi eziologica delle forme sostenute appunto da microrganismi "difficili" o non coltivabili.

Infine sulla diagnostica microbiologica delle endocarditi vogliamo anche ricordare che in corso di intervento operatorio possono essere esaminati, sempre con metodiche colturali, valvole cardiache e/o emboli settici.

Miocarditi

Le infiammazioni che colpiscono il miocardio spesso coinvolgono anche il pericardio con una delle due forme che predomina sull'altra. Difficilmente nelle miocarditi infettive in laboratorio si riesce ad individuare l'eziologia che in prevalenza è costituita da agenti virali e fra questi in particolare *Enterovirus*, *Cocksackievirus* tipo B e, meno frequentemente, *Herpes simplex*, *Adenovirus* e *Citomegalovirus*. Più raramente le miocarditi sono sostenute da agenti patogeni batterici sia con meccanismo diretto (formazione di ascessi metastatici in corso di invasione del torrente circolatorio in particolare da Meningococchi, Salmonelle, Stafilococchi e Streptococchi) o come

effetto a distanza dovuto a tossine come nel caso di *C.diphtheriae* e *C.perfringens* che possono agire anche con meccanismo diretto (*C.diphtheriae* attualmente non è segnalato in Italia). Altre forme di miocardite ad eziologia batterica sono dovute ad invasione per contiguità da parte di quei microrganismi presenti nelle valvole cardiache in corso di endocardite. Altri agenti più rari possono essere *Legionella sp.*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* o *psittaci*. Nei pazienti immunocompromessi oltre alle forme secondarie a sepsi da batteri opportunisti sono state descritte forme da miceti (anche da aspergilli e criptococco) e da *Toxoplasma gondii*.

La diagnosi microbiologica si esegue mediante emocoltura nelle rare forme batteriche secondarie ad invasione del torrente circolatorio e mediante la ricerca dell'infezione primaria nelle forme secondarie alla produzione di tossine. Di più difficile evidenziazione sono le forme sostenute da virus poiché si può solamente ricorrere alla ricerca di anticorpi circolanti (aumento del titolo di 4 volte nel secondo campione o alto titolo in anticorpi della classe IgM) che però non danno risultati di certezza. La diagnosi eziologica in queste forme può essere fatta mediante tecniche biomolecolari (amplificazione e/o ibridazione in situ) eseguite su frammenti biotici ma ovviamente solo nei casi in cui la biopsia abbia una preminente giustificazione ai fini clinici (diagnostico-terapeutici) date le possibili gravi complicazioni secondarie a tale manovra.

Pericarditi

Anche nella pericardite, a causa delle difficoltà della diagnosi microbiologica, è raro identificare l'agente patogeno per cui nella maggior parte dei casi le forme vengono definite idiopatiche. Da un punto di vista eziologico le forme di pericardite sono sostenute in prevalenza dagli stessi virus che causano le miocarditi mentre per quanto riguarda quelle batteriche, oltre a quelli già menzionati per le miocarditi, bisogna prendere in considerazione anche il possibile coinvolgimento di micobatteri ed anaerobi. La diagnosi microbiologica presenta i problemi già visti per le miocarditi infatti anche in questo caso la ricerca di anticorpi circolanti non è sufficientemente certa e quella diretta con ricerche di virus, batteri, miceti o parassiti può essere tentata solo se c'è una indicazione clinico terapeutica al prelievo di essudato e/o tessuto pericardico. E' ovvio che, in assenza di indicazione specifica del medico curante, in questi casi le indagini devono prevedere la ricerca del più ampio spettro possibile di agenti patogeni.

SC.2

DIAGNOSI MOLECOLARE: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE FUTURE

Pistello M.

*Dipartimento di Patologia Sperimentale,
Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia
Università degli Studi di Pisa*

La disponibilità di metodi molecolari per la rilevazione di acidi nucleici ha avuto un notevole impatto nel settore della diagnostica microbiologica. Numerosi metodi qualitativi e quantitativi sono già entrati in uso nella maggior parte di laboratori diagnostici e di ricerca contribuendo significativamente a diagnosi e stadiazione di malattie infettive, al *management* del paziente ed alla comprensione dei meccanismi patogenetici e di interazione agente patogeno-ospite. A fronte di questa realtà ormai consolidata, la diagnostica molecolare è un settore estremamente dinamico che, a seguito di una fattiva ed intensa ricerca applicata, si assiste alla continua introduzione di nuove tecnologie ed affinamento e miglioramento delle prestazioni di quelle già esistenti. Ciò si traduce nella rapida obsolescenza di tecniche ed apparecchiature già presenti sul mercato e su offerta e disponibilità di nuove apparecchiature in costante e rapido aumento.

In questo ambito, notevoli risorse sono investite nello sviluppo di sistemi molecolari quantitativi basati su tecnologia *real-time* e di apparecchiature per estrazione automatica. Il tutto nell'ottica della completa automazione ed integrazione della filiera: estrazione degli acidi nucleici dal campione in esame, test analitico, elaborazione ed emissione del risultato.

L'ottimizzazione dell'intero processo si traduce inoltre nella riduzione di tempi di analisi, lavoro manuale e costi. In questa presentazione verranno illustrati i principali metodi molecolari tradizionali e più innovativi presenti nel mercato e la loro applicabilità nel settore della diagnostica microbiologica. Particolare enfasi verrà posta sui metodi molecolari *real-time* applicati alla quantizzazione dei principali agenti infettivi responsabili di patologie in ambito cardiologico e sull'importanza del dato di laboratorio nella formulazione di diagnosi di infezione/malattia e nella definizione di un possibile trattamento terapeutico.