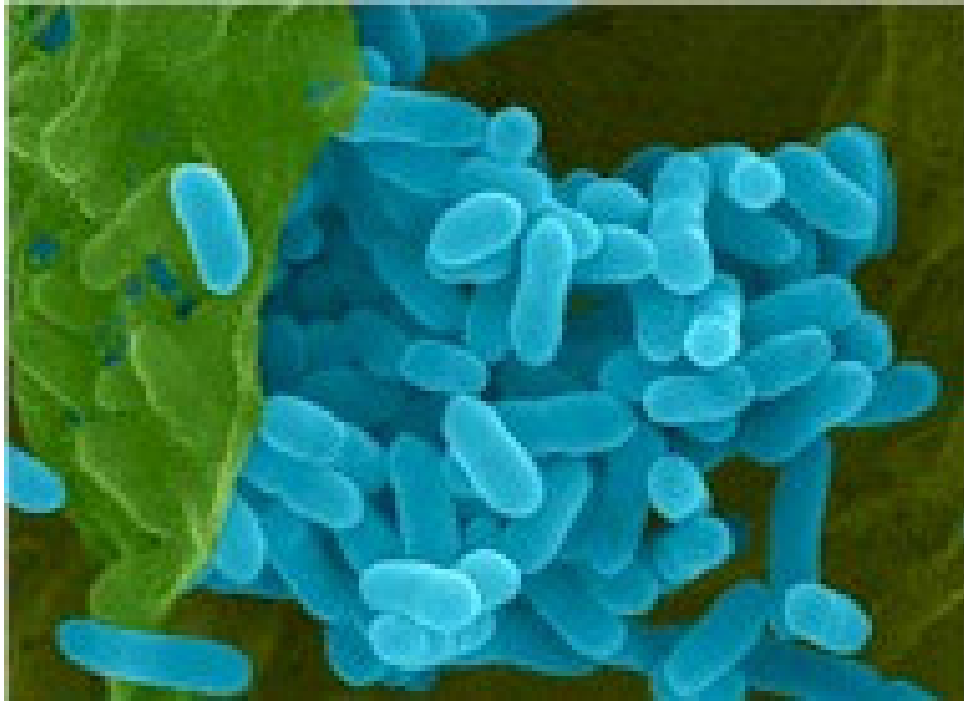


## Fibrosi cistica e microbiologia



*Silvia Campana, Flavio Favari, Graziana Manno,  
Novella Ravenni, Priscilla Cocchi,  
Lisa Cariani, Ersilia Fiscarelli e Francesco Callea*

## Fibrosi cistica e trapianti

*Serena Quattrucci, Francesca Pardo, Marco Spada*

## Fibrosi cistica e microbiologia

Silvia Campana, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze

La storia naturale della fibrosi cistica (FC) è condizionata principalmente dal grado di interessamento del polmone, che si manifesta con un progressivo decremento della funzionalità respiratoria. Le infezioni polmonari si presentano con modalità ricorrente e cronica e persistono per tutta la durata della vita dei pazienti, generando quello stato di flogosi permanente che sta alla base del danno polmonare. Il polmone di pazienti con FC rappresenta un ambiente favorevole alla colonizzazione da parte di batteri patogeni opportunisti. Negli individui sani i batteri inalati vengono rimossi dalla clearance mucociliare e distrutti dal pH acido dello stomaco; i patogeni che eventualmente riescono a superare la clearance mucociliare sono poi eliminati da cellule fagocitiche, aiutate da meccanismi immunologici di vario tipo, inclusi specifici anticorpi opsonizzanti. La colonizzazione batterica delle vie aeree in FC è una combinazione di vari fattori, primi tra i quali gli effetti patofisiologici conseguenti al difetto del gene CFTR, a causa del quale la clearance mucociliare polmonare è ostacolata dalle secrezioni disidratate, e l'abilità di un certo spettro di batteri opportunisti a superare le normali difese polmonari.

La suscettibilità dei pazienti con FC alle infezioni polmonari è nota fin dal 1940; fino all'avvento della terapia antibiotica la maggior parte dei pazienti moriva prima di raggiungere i 5 anni di età, principalmente a causa di infezioni causate da *Staphylococcus aureus*. L'introduzione della penicillina, unitamente ad un programma terapeutico di vasta portata e ad un *follow-up* dei pazienti, effettuato in centri specializzati, ha migliorato in modo drastico la prognosi della malattia e la mortalità è passata dal 61% del 1944 al 18% del 1948. Tutto questo ha consentito di prolungare le aspettative di vita e la media di sopravvivenza arriva oggi a 31,3 anni (CFF, 1998). I dati prospettici indicano, inoltre, uno spostamento della media di sopravvivenza intorno ai 40 anni, il che implica un aumento del numero di pazienti adulti affetti da questa patologia, che attualmente costituiscono circa la metà degli assistiti. Le manifestazioni acute delle malattie del tratto respiratorio sono causate principalmente da batteri (63%), da batteri e virus (13%) e da virus (6%).

### Infezioni virali

I virus respiratori (virus dell'influenza A e B, virus parainfluenzale 1 e 3, *Rhinovirus*, *Adenovirus* e

virus respiratorio sinciziale) sono responsabili di alcune esacerbazioni acute della patologia polmonare dei pazienti con FC. Di conseguenza, la funzionalità polmonare di questi pazienti può diminuire del 30% durante le infezioni respiratorie virali. Nell'età pediatrica, a seguito dell'infezione da virus respiratorio sinciziale, si riscontra una maggiore suscettibilità batterica, particolarmente nei confronti di *P. aeruginosa*. Le infezioni virali si comporterebbero quindi da eventi scatenanti. Alcuni studi hanno poi dimostrato che il virus dell'influenza di tipo A può essere associato a grave deterioramento polmonare in pazienti FC e che nei pazienti in fase avanzata di malattia può determinare la morte. Questi dati enfatizzano l'importanza della vaccinazione antiinfluenzale in tale popolazione di pazienti.

### Infezioni da miceti

*Aspergillus fumigatus* si ritrova frequentemente nelle colture delle secrezioni respiratorie dei pazienti con FC. In una percentuale che va dal 5 al 15% circa degli adulti FC, l'infezione da *A. fumigatus* si associa ad aspergillosi broncopolmonare allergica, che si manifesta con sintomatologia di tipo asmatico. Anche *Candida albicans* può essere frequentemente reperita nell'escreato degli adulti FC. Recentemente un ruolo importante è stato riconosciuto anche a *Scedosporium apiospermum*. Inoltre altre specie di miceti sono saltuariamente isolate dai campioni di pazienti con FC. Non ci sono comunque dati che indichino un ruolo dei miceti nella patologia polmonare FC. Tuttavia nei pazienti che sono stati sottoposti a trapianto polmonare la colonizzazione da miceti può avere gravi implicazioni cliniche ed è quindi molto importante che il laboratorio di microbiologia sia in grado di segnalarli correttamente.

### Infezioni batteriche

Le infezioni polmonari causate da batteri sono particolarmente rilevanti nei pazienti affetti da FC per due principali motivi: rappresentano il fattore di innesco e di mantenimento delle lesioni polmonari e sono la principale causa di malattia e mortalità in FC. La microbiologia delle infezioni polmonari batteriche in FC ha molti aspetti singolari:

- una localizzazione per lo più esclusiva e cronica del germe a livello delle vie aeree, con episodi di esacerbazione che si sovrappongono al quadro di base;

- i pazienti con FC non hanno alcuna deficienza immunitaria e seppur colonizzati da germi fin dai primi mesi di vita, raramente manifestano episodi di batteriemia clinicamente rilevanti. Eccetto che per il tratto respiratorio, i pazienti FC non sono più suscettibili degli individui sani alle infezioni;

- le infezioni respiratorie sono causate da un limitato numero di germi opportunisti, di solito *S. aureus*, nei primi anni di vita, e da batteri Gram-negativi non fermentanti (principalmente *P. aeruginosa*) negli anni successivi: infatti con il progredire dell'età del paziente la flora patogena tende a modificarsi;

- una volta avvenuta la colonizzazione da parte di un batterio, si assiste alla sua diffusione a livello di tutto l'apparato respiratorio. Il sistema immunitario dell'ospite è però inefficiente a risolvere l'infezione e nel suo complesso la risposta immune è oggi giudicata più dannosa che utile a causa dei danni provocati dagli immunocomplessi e di uno squilibrio a favore delle citochine pro-infiammatorie, come interleuchina-8 (IL-8) e tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ );

- i germi, a seguito della terapia antibiotica utilizzata, sviluppano progressivamente meccanismi di resistenza che rendono problematico il trattamento delle infezioni;

- esistono ceppi batterici altamente trasmissibili responsabili di infezioni crociate tra pazienti.

I germi patogeni più comunemente responsabili delle infezioni polmonari in pazienti con FC sono batteri appartenenti alle specie *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* e altri batteri non fermentanti il glucosio come *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* e microrganismi appartenenti al *Burkholderia cepacia* complex (Bcc).

I pazienti con FC vanno incontro a infezioni respiratorie fin dai primi mesi di vita; nei bambini piccoli i batteri più frequentemente riscontrati sono *S. aureus* e *H. influenzae*, ma possono essere presenti anche microrganismi come *Streptococcus pneumoniae* e *Enterobacteriaceae*. *S. aureus* è un germe che si ritrova a livello delle cavità nasali del 10% della popolazione sana; la sua facilità a colonizzare la vie aeree dei pazienti fibrocistici è legata all'alto contenuto di NaCl delle secrezioni bronchiali. Poiché è stato osservato che i primi batteri che colonizzano il polmone FC sono *S. aureus* e *H. influenzae*, seguiti successivamente da *P. aeruginosa*, è stato ipotizzato che i primi possano esacerbare l'infiammazione, così da facilitare la seguente colonizzazione delle vie aeree da parte di *P. aeruginosa*.

Le indagini legate alle infezioni polmonari della FC

rappresentano una nicchia all'interno del vasto panorama della microbiologia diagnostica. Infatti molti aspetti di questa branca appaiono altamente specialistici, basti pensare allo spettro di microrganismi che interessa questa patologia polmonare; sono in genere un numero molto ristretto di opportunisti che, viste le condizioni estreme dell'habitat di crescita (dovute al particolare microambiente costituito dal polmone FC, ma anche dall'enorme pressione selettiva esercitata dalla terapia antibiotica) hanno caratteristiche peculiari. I batteri infatti reagiscono mettendo in moto una serie di meccanismi di adattamento. La varietà, la ricchezza, e la rapidità di tali adattamenti è sconcertante e ci ricorda che un microrganismo così piccolo e semplice come una cellula batterica non deve mai essere sottovalutato in quanto dimostra una plasticità sconosciuta a molte altre forme di vita.

Per ricordare solo alcuni di questi meccanismi ricordiamo che si isolano dalle vie respiratorie dai pazienti FC batteri che hanno un altissimo tasso di mutazioni genetiche (ceppi ipermutabili) che permettono loro di aumentare le loro possibilità di adattamento; alterazione di attività metaboliche con per diventare meno sensibili l'azione dei farmaci ed anche anomalie metaboliche, in genere sfavorevoli, quali l'incapacità di sintetizzare alcune sostanze (auxotrofismo) vengono trasformate in un vantaggio selettivo. Le cellule batteriche stimolate da questo ambiente particolare di crescita possono organizzarsi, sfruttando funzionali network di comunicazione, in architetture particolari (biofilm) producendo una matrice esterna che li protegge dalle difese dell'ospite e dall'azione dei farmaci.

Appare quindi chiaro che cimentarsi con questa particolare branca della microbiologia diagnostica rappresenta una sfida per il microbiologo, in corsa continua per contrastare i cambiamenti dovuti agli adattamenti a cui le cellule batteriche vanno incontro per sopravvivere. Specifici e continuamente aggiornati dovranno essere infatti gli approcci tecnici con cui si avvicina a questo gruppo particolarmente difficile di patogeni polmonari.

Anche se peculiare, questa nicchia della microbiologia può rappresentare, per molti aspetti, un modello; ad esempio la selezione e l'evoluzione di microrganismi resistenti particolarmente spinta in questo settore può far capire in che modo evolveranno le infezioni da batteri gram negativi non fermentanti quali *P. aeruginosa* in molti altri ambienti e può condizionare la scelta generale dei protocolli e dei trattamenti diagnostici.

## Microbiologo e Clinico: una collaborazione possibile e doverosa

Flavio Favari, Servizio di Microbiologia, Immunologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Verona

Il microbiologo ed il clinico sono due figure fondamentali per la gestione del paziente con fibrosi cistica (FC). Purtroppo nella pratica quotidiana la comunicazione fra i due è scarsa se non assente: da una parte il clinico si limita a sollecitare referti che mai arrivano e quando arrivano, qualora corretti, ormai sono inutili... dall'altra parte il microbiologo si limita ad inviare dati con la "sicurezza" che in ogni caso saranno poco letti ed ancor più male interpretati.

Di questa dinamica, spesso dovuta ai carichi di lavoro che gravano su entrambe le figure, chi ne subisce le conseguenze è il paziente.

Il clinico spesso utilizza i dati microbiologici alla stregua dei valori biochimici (facilmente interpretabile e riproducibili presso laboratori diversi), diversamente il referto microbiologico è strettamente legato alle competenze del microbiologo e della sua equipe e quindi va sempre "letto" assieme a loro.

Pur utilizzando le medesime apparecchiature d'avanguardia, i risultati ottenuti da due laboratori di microbiologia differiranno in base alle competenze e all'esperienza presenti nelle singole unità di lavoro, con in più l'aggravante che in ogni caso verrà fornito un dato che potrebbe però essere fuorviante (il mancato rilevamento della variante small colony dello *S. aureus* è dovuto alla sua reale assenza nel materiale o dall'incapacità dell'equipe di rilevarne la presenza??!).

Quindi si può sempre avere un referto microbiologico, ma è importante verificare che quest'ultimo fornisca la reale e completa visione dei germi presenti e che l'antibiogramma proposto sia il più idoneo: dati microbiologici non errati ma parziali possono provocare enormi danni alla gestione complessiva del paziente FC.

Il clinico deve essere rassicurato sulla reale competenza dell'equipe microbiologica che viene costantemente saggiata mediante controlli di qualità interni ed esterni (ben più importanti) che permettono di rilevare prontamente le eventuali carenze che faranno decidere se investire in formazione o, consci dei propri limiti, delegare alcune problematiche a centri di livello superiore.

Da parte sua il microbiologo deve essere sicuro che i suoi dati vengano prontamente utilizzati e correttamente interpretati.

Per fare in modo che le indagini di laboratorio diano risultati di eccellenza queste devono essere sempre guidate dall'anamnesi e dall'andamento clinico del paziente, ed è quindi fondamentale che

il microbiologo, a fianco del radiologo e dell'infettivologo, partecipi alle riunioni cliniche che decidono la gestione del paziente.

Il microbiologo deve aiutare il clinico a sfruttare completamente le potenzialità del laboratorio: dopo aver valutato assieme il rapporto costo/beneficio, si dovrà decidere assieme quali farmaci testare, quale tecnica di antibiogramma adottare, quando e a chi fare lo studio di associazione di farmaci etc.

Da parte sua il clinico deve essere disponibile a confrontarsi con un collega che metterà in discussione le sue scelte terapeutiche e che vorrà capire tutte le fasi della gestione del malato.

Questa stretta collaborazione porterà, qualora il laboratorio non rilevasse un germe atteso dal clinico (per condizioni del paziente e letteratura), a dubitare della correttezza del referto, con conseguente ripetizione dell'indagine, ponendo ancora maggiore attenzione a tutte le fasi (modalità di raccolta, tempi di consegna, terreni selettivi etc) e da ultimo andando a verificare le reali capacità dell'equipe microbiologica di rilevare quel particolare germe, decidendo, eventualmente, di inviare il materiale ad un centro di riferimento nazionale o internazionale.

Va poi ricordato che la "mitica" Minima Concentrazione Inibente (MIC), così cara ai clinici, si riferisce a concentrazioni ematiche, prescindendo dalla farmacocinetica e dalla farmacodinamica ed il laboratorio può valutarla con precisione utilizzando tecniche laboriose e dispendiose o può calcolarla, risparmiando tempo e denaro (ma con qualità del referto decisamente inferiore).

Dovendo scegliere fra due farmaci, non è detto che quello con la MIC più bassa vada meglio, si deve valutare il tropismo d'organo e qualora sia sovrapponibile, si deve considerare il rispettivo breakpoint di sensibilità, andando quindi a confrontare il Quoziente BreakpointS/MIC (MBQ) che valuta il rapporto che intercorre tra MIC e breakpoint di sensibilità di ciascun farmaco.

Per concludere questa breve riflessione, appare chiaro che il microbiologo e il clinico otterrebbero entrambi grossi vantaggi nel collaborare infatti, il primo disporrebbe finalmente di buoni e rapidi dati di laboratorio ed il secondo allontanerebbe il rischio della routine in quanto, dietro ogni materiale, riuscirebbe a vedere un paziente unico e prezioso, il cui benessere deve sempre guidare le nostre scelte operative.



---

# **Staphylococcus aureus in Fibrosi Cistica: aspetti microbiologici e diagnostici**

*Graziana Manno, Laboratorio Generale di Analisi, Sezione Microbiologia della Fibrosi Cistica  
Istituto G. Gaslini e Università degli Studi di Genova*

La colonizzazione delle vie aeree da parte di *Staphylococcus aureus* (SA) è frequente nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC), in particolare quelli d'età pediatrica. Quando la FC fu descritta per la prima volta, la maggior parte dei pazienti sopravviveva fino all'età di 5 anni ed il germe principalmente responsabile delle infezioni polmonari era rappresentato appunto da SA.

Attualmente, nella prima decade di vita, il 25-30% dei pazienti presentano positività per SA nelle colture di espettorato. Tale frequenza è probabilmente sottostimata nei bambini che non espettorano, nei quali la colonizzazione può solo essere dimostrata mediante colture del BAL.

L'infezione da SA è solitamente sintomatica, ma è talvolta presente anche un carriage asintomatico.

Studi di genotipizzazione di ceppi di SA isolati da pazienti FC, hanno mostrato la stretta correlazione tra ceppi isolati dalle narici e quelli isolati dall'espettorato, suggerendo che la colonizzazione iniziale della mucosa nasale con SA, mette le basi per la successiva infezione delle basse vie respiratorie. L'infezione da SA normalmente precede la colonizzazione cronica delle vie respiratorie da parte di *Pseudomonas aeruginosa*, continua nell'età adulta con il 50% e oltre dei pazienti con colture positive per SA. La somministrazione di antibiotici è spesso inefficace nell'eradicare SA dal pomone FC, anche di ceppi antibiotico sensibili, in generale si hanno infezioni ricorrenti da parte dello stesso ceppo iniziale.

Il ruolo di SA nella progressione della malattia polmonare in FC rimane non chiaro, ma l'osservazione clinica di una rapida ricolonizzazione dopo trattamento antibiotico, suggerisce che SA riesce a persistere all'interno delle cellule del polmone, e produrre infezioni ricorrenti.

L'infezione da SA è sicuramente favorita da fattori FC-specifici; infatti, nonostante il 30% circa degli individui sani siano carriers nasali di SA, l'infezione delle basse vie respiratorie non è presente in questa popolazione. La patogenesi dell'infezione stafilococcica nei pazienti FC è complessa: SA possiede sulla sua superficie batterica una grande varietà di molecole, in genere di natura proteica, in grado di legarsi alle membrane, agendo come adesine per differenti strutture superficiali. Sull'epitelio polmonare vi sono recettori per queste adesine: glicolipidi di

membrana, fibronectina, collagene, laminina, vitronectina e proteoglicani. Questi fattori, spiegano la possibilità per SA di infettare e persistere nelle basse vie respiratorie in FC. La persistenza e la dinamica delle infezioni polmonari da SA in FC, unite alla ridotta viscosità ed all'insufficiente clearance polmonare, favoriscono l'insorgenza di una sottopopolazione di ceppi con fenotipo denominato small colony variant (SCV), con caratteristiche morfologiche notevolmente diverse da quelle normalmente conosciute e studiate nei ceppi wild-type di SA. Caratteristica di tali ceppi è di crescere con colonie puntiformi, non emolitiche e non pigmentate in agar sangue, e di essere auxotrofi per timidina e/o emina e/o menadione per un blocco del trasporto degli elettroni.

Il fenotipo SCV risulta una forma adattativa in risposta ai fattori di stress a cui è sottoposto SA nell'ambiente polmonare. La diminuita espressione di alfa-emolisina da parte dei ceppi SA-SCV permette loro di sopravvivere all'interno delle cellule. Questa localizzazione intracellulare li protegge dalle difese dell'ospite e dalla pressione degli antibiotici che non riescono a penetrare all'interno della cellula eucariotica. L'alterazione del trasporto degli elettroni si traduce in un decremento dell'"uptake" degli agenti antimicrobici che richiedono un trasporto attivo per penetrare all'interno della cellula microbica (es. aminoglicosidi). La lenta crescita dei ceppi SCV è un altro fattore che riduce gli effetti dei farmaci, come i beta-lattamici, attivi sui batteri in fase di rapida crescita. Molti ceppi SCV isolati in FC presentano auxotrofismo verso la timidina, e la loro emergenza può essere correlata a terapie di lunga durata condotte, ad esempio con cortrimossazolo. Gli isolati di SA-SCV in genere mostrano un grado più elevato di resistenza agli antibiotici dei ceppi con fenotipo normale; inoltre i pazienti colonizzati da questi fenotipi sono più grandi e co-colonizzati da *P.aeruginosa* e mostrano condizioni cliniche più compromesse rispetto ai pazienti colonizzati solo dal fenotipo normale. In contrasto con la crescita di SA "wild-type" su agar sangue, gli SCV timidino-dipendenti crescono in colonie, dette a "uovo fritto" con bordi traslucidi e una piccola parte centrale pigmentata, o anche in colonie tipo "pin point" che sono circa 10 volte più piccole delle normali colonie di SA.

Altri fenotipi di SA riscontrati nei pazienti FC sono i ceppi mucosi, produttori di biofilm. Inizialmente fu usato in letteratura il termine "slime" per descrivere la sostanza mucosa di alcune colonie di ceppi di *Staphylococcus*, in seguito si scoprì che tale "slime" era, nella maggior parte dei casi, un'adesina intracellulare polisaccaridica che consolida l'adesione batterica e promuove la produzione di biofilm. Il biofilm svolge un ruolo importante nella protezione dei microrganismi sia dall'azione di antibiotici, mantenendo vitali i germi al suo interno, sia dalle difese aspecifiche e specifiche dell'organismo ospite quali la fagocitosi, l'attività degli anticorpi e del complemento.

In aumento nei pazienti FC, ed un problema sia terapeutico, sia di controllo delle infezioni, sono i ceppi di SA resistenti alla meticillina (MRSA). E' ancora tuttavia da chiarire il reale ruolo di MRSA nel decorso della malattia polmonare. La resistenza alla meticillina è da mettere in relazione alla presenza del gene *mecA* che codifica la PBP2a. Il gene *mecA* (2,1 kb) è inserito in un blocco più ampio di DNA (fino a 60 kb), denominato *staphylococcal chromosomal cassette* (SCC*mec*), che è incorporato nel cromosoma di SA in un sito specifico. Come SCC*mec* s'intende una nuova classe di elementi mobili che, oltre ai geni *mec* e ai geni delle recombinasi responsabili della mobilità, contengono i determinanti di resistenza per vari antibiotici.

L'isolamento e l'identificazione degli SA-SCV possono essere difficile per i microbiologi clinici in quanto il tipo di crescita, tipicamente più lenta, l'assente o minore pigmentazione e l'assenza d'emolisi, conducono ad un riconoscimento difficoltoso di questi fenotipi nelle colture primarie di campioni d'espettorato. Inoltre, il pervenire ad una corretta identificazione di specie è spesso problematico. Le metodiche di laboratorio standardizzate (disco-diffusione, diluizioni in brodi) e normalmente utilizzate per la determinazione della sensibilità agli antibiotici dei ceppi wild-type, non sono applicabili ai ceppi SCV a causa della loro lenta crescita e delle loro esigenze culturali (auxotrofismo). Ne risulta quindi che una corretta determinazione della sensibilità ai farmaci antimicrobici di questo fenotipo è difficilmente ottenibile.

Attualmente, nella popolazione di pazienti FC, si assiste ad un incremento della frequenza d'isolamento di ceppi MRSA, alcuni di loro presentano un fenotipo SCV. Questi ceppi possono diffondersi nella comunità dei pazienti FC al pari degli MRSA con fenotipo normale con

evidenti implicazioni nella gestione del controllo delle infezioni nei Centri Regionali per la cura dei pazienti affetti da FC.

Alcuni MRSA, ma anche alcuni ceppi di MSSA (SA - meticillino sensibili) possono produrre tossine citolitiche, tra cui una denominata Panton-Valentine leucocidina, tossica per molte cellule (leucociti, eritrociti, macrofagi, piastrine, fibroblasti). Questi ceppi sono in grado di causare gravi infezioni cutanee e polmonari. Sono stati descritti casi di infezione da ceppi di SA che veicolano questa leucocidina anche tra i pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

### **Isolamento e identificazione fenotipica dei ceppi SA-SCV**

I campioni delle vie aeree, devono essere processati e coltivati in accordo alle linee guida nazionali per i pazienti FC. Dopo almeno 48h d'incubazione, si esegue la ricerca colturale di SA:

- tutti i diversi morfotipi positivi per la fermentazione del mannitolo presenti sul MSA (Mannitol Salt Agar) devono essere i sub-colturati contemporaneamente in agar sangue (AS) e terreno semplice (es agar Mueller-Hinton)
- si procede con un'ulteriore incubazione per 24h a 35° C.

**NB** Le varianti SCV sono definite sulla base della crescita in AS con colonia puntiforme, assenza d'emolisi e pigmento, e mancata crescita in terreno semplice privo di timidina e/o emina e/o menadione. .

- Eseguire l'identificazione di specie dalle colture pure mediante: prova della catalasi, Latex-agglutinazione per clumping-factor e proteina A (es Pastorex Staph Plus, Biorad) ed eventuale confermare con tests biochimici. NB l'API ID 32 Staph, (bioMérieux), con incubazione di 24-48 ore si è dimostrato il sistema migliore nell'identificazione di specie dei ceppi SA-SCV.

**Conferma di specie mediante test molecolari.** I ceppi fenotipicamente identificati come SA-SCV possono essere confermati con test molecolari, mediante, ad esempio, l'amplificazione del gene specie specifico della termonucleare di SA (gene *nuc*).

### **Caratterizzazione del tipo di auxotrofismo.**

Per caratterizzare il tipo di auxotrofismo, si utilizzano dischetti contenenti soluzioni di emina, menadione e timidina. Per l'emina i dischetti commerciali X-Factor (Oxoid) in uso per la determinazione delle esigenze nutrizionali di *Haemophilus* spp.; per la timidina e il menadione, dei dischetti sterili sono impregnati con 15 mcg/ml di una soluzione contenente 100 mcg/ml di

timidina o di una soluzione contenente 10 mcg/ml di menadione. Per la determinazione dell'auxotrofismo, seminare delle piastre di Mueller Hinton agar (normalmente prive di timidina, emina e menadione) con una sospensione batterica pari allo 0.5 della scala di Mc Farland; in seguito deporre opportunamente i dischetti contenenti emina, timidina e menadione. L'auxotrofismo si evidenzia, dopo 24h d'incubazione a 35°C, da un alone di crescita batterica intorno ad uno o più dischetti testati.

### Test fenotipici di sensibilità agli antibiotici.

Per la valutazione della sensibilità ai farmaci antibatterici e la meticillino resistenza dei ceppi di SA-SCV, è consigliata la metodica standardizzata della disco-diffusione su Mueller-Hinton con il 5% di sangue di montone, in cui è testato il dischetto di cefoxitina. Infatti il Mueller-Hinton agar semplice e l'oxacillin-screening agar, in quanto terreni semplici, non permettono la crescita dei ceppi SA-SCV. Le piastre devono essere incubate per 24h a 35°C, i risultati devono essere interpretati secondo i *breakpoints* proposti dal CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) per SA. Un valido terreno per uno screening dalle colonie di SCV per la meticillino resistenza è l'MRSA agar (Bio Merieux). Per l'identificazione della meticillino resistenza può essere utilizzato anche l' MRSA-Screen latex agglutination test.

### Determinazione molecolare della meticillino-resistenza.

La meticillino resistenza nei ceppi SCV può essere confermata mediante PCR, evidenziando la presenza del gene *mecA*.

### BIBLIOGRAFIA

- Goerke C, Gressinger M, Endler K, Breitkopf C, Wardecki K, Stern M, Wolz C, Kahl BC. High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environ Microbiol.* 2007 Dec;9(12):3134-42.
- Moore ZS, Jerris RC, Hilinski JA. High prevalence of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2007 Aug 23
- Ridder-Schaphorn S, Ratjen F, Dübbers A, Häberle J, Falk S, Küster P, Schuster A, Mellies U, Löwe B, Reintjes R, Peters G, Kahl BC. Nasal *Staphylococcus aureus* carriage is not a risk factor for lower-airway infection in young cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2007 Sep;45(9):2979-84.
- Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Gerritsen SA, Flier A, Kimpen JL, Wolfs TF. Macrolide-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in cystic fibrosis patients: is there transmission to household contacts? *J Antimicrob Chemother.* 2007 Sep;60(3):665-8. Epub 2007 Jun 29.
- Elizur A, Orscheln RC, Ferkol TW, Dunne WM Jr, Storch GA, Cannon CL. Transmission of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* between patients with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 2007 Jul;151(1):90-2.
- Ren CL, Morgan WJ, Konstan MW, Schechter MS, Wagener JS, Fisher KA, Regelman WE; The Investigators and

- Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatr Pulmonol.* 2007 Jun;42(6):513-8.
- Elizur A, Orscheln RC, Ferkol TW, Atkinson JJ, Dunne WM Jr, Buller RS, Armstrong JR, Mardis ER, Storch GA, Cannon CL. Panton-Valentine Leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lung infection in patients with cystic fibrosis. *Chest.* 2007 Jun;131(6):1718-25
- Vergison A, Denis O, Deplano A, Casimir G, Claeys G, DeBaets F, DeBoeck K, Douat N, Franckx H, Gigi J, Ieven M, Knoop C, Lebeque P, Lebrun F, Malfroot A, Paucquay F, Pierard D, Van Eldere J, Struelens MJ. National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in Belgian cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother.* 2007 May;59(5):893-9
- Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus TA. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov 15
- von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury.* 2006 May;37 Suppl 2:S26-33.
- Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G, von Eiff C. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *J Clin Microbiol.* 2005 Apr;43(4):1956-9.
- Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, Malouin F. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004 May 1;41(1):35-41
- Kipp F, Becker K, Peters G, von Eiff C. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar;42(3):1277-9.
- Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, Reilly M, Harms E, Proctor RA, Herrmann M, Peters G. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep;41(9):4424-7.
- Kahl BC, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G. Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):410-3.
- Sadowska B, Bonar A, von Eiff C, Proctor RA, Chmiela M, Rudnicka W, Rozalska. Characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002 Feb 18;32(3):191-7
- von Eiff C, Proctor RA, Peters G. *Staphylococcus aureus* small colony variants: formation and clinical impact. *Int J Clin Pract Suppl.* 2000 Dec;(115):44-9. Review.
- Looney WJ. Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci.* 2000;57(4):317-22
- Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1998 Apr;177(4):1023-9.
- Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 1995 Jan;20(1):95-102.
- Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis.* 1994 Dec;3(6):302-12.



## **Pseudomonas aeruginosa**

*Silvia Campana, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze*

*P. aeruginosa* rappresenta il principale patogeno respiratorio dei pazienti affetti da FC (Jones *et al.*, 2002). Infatti, negli Stati Uniti il 29.8% dei pazienti tra 2 e 5 anni e che l'81.3% dei pazienti tra 26 e 30 anni sono infettati con *P. aeruginosa*, simili prevalenze sono stati osservate anche in paesi Europei.

*P. aeruginosa* è un bacillo Gram-negativo aerobio obbligato, non fermentante, asporigeno, ubiquitario in natura, essendo diffuso in acqua, suolo e piante. Nonostante ciò, esso è un patogeno nosocomiale di notevole rilevanza data la sua capacità di sopravvivere in numerose condizioni ambientali come quelle che si ritrovano nell'ambiente ospedaliero (lavandini, soluzioni di lavaggio, disinfettanti, endoscopi, spirometri, piscine per fisioterapia). Nei soggetti sani, *P. aeruginosa* è considerato un patogeno opportunisto che, occasionalmente, colonizza la cute, l'orecchio esterno, le vie respiratorie superiori o l'intestino crasso. Le più importanti infezioni sostenute da *P. aeruginosa* sono quelle polmonari, le setticemie, otiti, infezioni urinarie e oculari, endocarditi e infezioni delle ustioni.

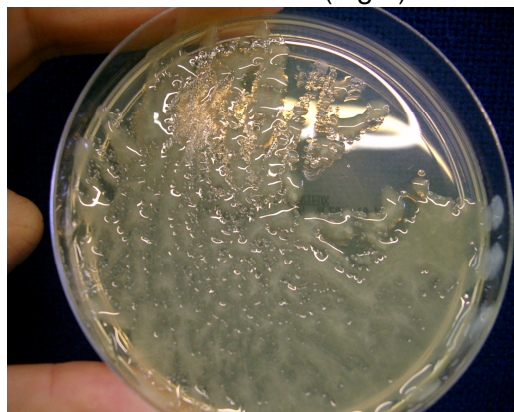
La ragione della peculiare predilezione di *P. aeruginosa* per l'epitelio del polmone di pazienti con FC al momento non è nota, ma recenti studi hanno fornito varie considerazioni utili a spiegare la colonizzazione microbica e la prevalenza di tale germe in questi pazienti.

Le alterazioni della proteina CFTR caratteristiche della fibrosi cistica causano una variazione ridotta dei glicolipidi e delle glicoproteine delle membrane apicali, che vanno a costituire efficienti recettori per le adesine di *P. aeruginosa*. Nelle condizioni di ridotti livelli di idratazione che si ritrovano nelle vie aeree dei pazienti con fibrosi cistica, la normale attività mucociliare può non essere efficiente nel rimuovere batteri e altri patogeni intrappolati nella barriera mucosa. Dal momento che la colonizzazione da parte *P. aeruginosa* segue quella di altri patogeni, è possibile che una preesistente infiammazione e l'incapacità di incrementare la *clearance* mucociliare in risposta alla stimolazione porti alla progressiva colonizzazione con vari microrganismi, incluso *Pseudomonas* (Govan *et al.*, 1996).

La colonizzazione da parte di *P. aeruginosa* è stata suddivisa in due periodi: una prima fase di **colonizzazione precoce** e intermittente presenza del germe (Burns *et al.* 2001) e una seconda fase di infezione cronica. La prima fase è stata

descritta come un periodo caratterizzato dallo sporadico isolamento del batterio e normali livelli di specifici anticorpi anti-*P. aeruginosa* nel siero del paziente (Høiby *et al.*, 2005); tale periodo sembra non causare un significativo declino della funzionalità polmonare e può protrarsi per un periodo di tempo variabile da 0 a 5.5 anni. I ceppi batterici responsabili della prima colonizzazione sono simili a quelli isolati dall'ambiente, caratterizzati da rapida crescita, fenotipo non mucoide e una relativa sensibilità agli antibiotici (Jensen *et al.* 1997).

La fase successiva nella naturale progressione della malattia è lo stabilirsi di un'**infezione cronica**, che è stata definita (Johansen *et al.*, 1992) come una condizione in cui il batterio è presente in coltura per un periodo di tempo minimo di sei mesi e/o in cui c'è un incremento della risposta immunitaria valutabile tramite la presenza elevati livelli di anticorpi specifici anti-*P. aeruginosa* (Govan, Deretic, 1996). Durante l'infezione cronica la popolazione batterica si adatta all'ambiente delle vie aeree FC. Tale processo è correlato con un notevole riarrangiamento genetico con accumulo di mutazioni responsabili della perdita della funzionalità di alcuni geni di *P. aeruginosa* (Smith *et al.* 2006). Una mutazione molto comune in questa fase riguarda il gene *muca* (Martin *et al.* 1993) che causa la transizione da fenotipo non mucoide a mucoide caratterizzato dalla overproduzione di alginato, un polisaccaride che circonda la cellula batterica (Fig 1)



All'interno di questa matrice i batteri crescono aggregate in microcolonie, organizzate in biofilm. Le conseguenze della biosintesi dell'alginato da parte di ceppi mucoidi nel polmone di pazienti con FC sono stati ampiamente studiati (Pedersen SS, 1992) ed includono lo stabilirsi e l'intrattabilità della



colonizzazione batterica e la progressiva infiammazione polmonare cui segue la malattia.

Altri cambiamenti legati al cronicizzarsi dell'infezione includono: la perdita della motilità, la perdita di un componente (antigene O) del lipopolisaccaride (LPS), la comparsa di varianti auxotrofe (Barth *et al* 2005, Luzar *et al* 1985)

La colonizzazione cronica da parte di *P. aeruginosa* è quindi attualmente considerata un evento prognostico sfavorevole per i pazienti con FC, e la prevenzione o, per lo meno, il ritardo dell'evento tramite una aggressiva **terapia al momento della prima colonizzazione**, diminuisce l'insorgenza di resistenza, riduce il numero di trattamenti antibiotici (con significativa riduzione dei costi) con importanti implicazioni per la prognosi a lungo termine (Munck *et al*, 2001, Taccetti *et al* 2005). La percentuale di ceppi multi o pan resistenti è in preoccupante aumento in molti ambiti clinici compresa l'FC ponendo il problema di quali misure possano essere adottate per prevenire l'insorgenza di resistenze.

**Resistenze di *Pseudomonas aeruginosa*.** *P. aeruginosa* può sviluppare la resistenza ad un agente antimicrobico attraverso i seguenti meccanismi:

- alterazione del bersaglio contro il quale è diretto il farmaco
- diminuito uptake
- sviluppo di sistemi d'efflusso
- inattivazione o modificazione del farmaco

Tra i meccanismi di resistenza agli agenti antimicrobici si distinguono:

- resistenze intrinseche o naturali
- resistenze acquisite

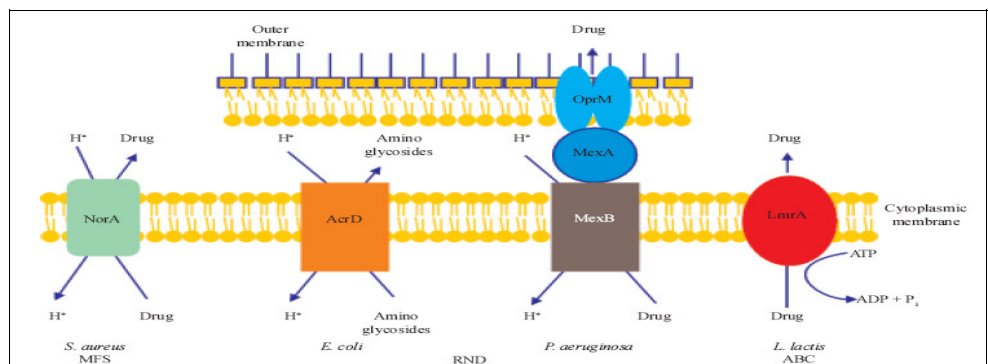
**La resistenza intrinseca** è dovuta a caratteristiche legate alla fisiologia batterica e comprende:

- struttura della parete batterica
- meccanismo delle pompe d'efflusso
- formazione del biofilm

**La parete** circonda e racchiude completamente il batterio, e conferisce al batterio molte proprietà: forma, carattere antigene, protezione dalla lisi per osmosi, sensibilità ai batteriofagi e agli agenti chimici.

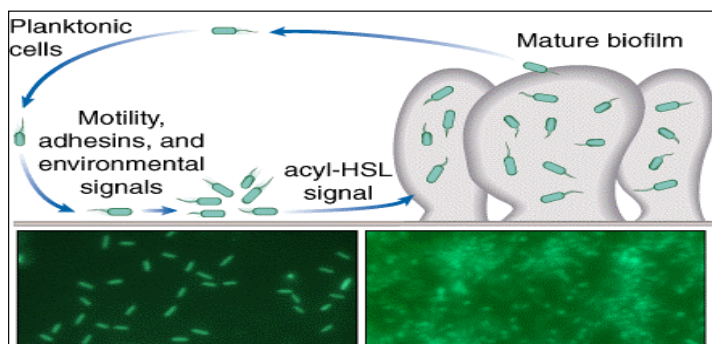
**Le pompe d'efflusso** sono sistemi che hanno la capacità di estrarre attivamente il farmaco e si basano sul principio secondo cui, per impedire

l'ingresso del farmaco, è necessario estruderlo ad una velocità maggiore rispetto a quella d'ingresso. Per *P. aeruginosa* sono state finora descritte 4 pompe d'efflusso (De Kievit *et al*. 2001). I geni che codificano queste pompe sono organizzati come operoni, con il primo gene che codifica una proteina di membrana il secondo gene codifica il trasportatore che esporta la sostanza attraverso la membrana interna e infine un terzo gene codifica una proteina associata alla membrana esterna che facilita il passaggio del substrato all'esterno. Questi tre componenti formano un canale che collega la membrana citoplasmatica e la membrana esterna permettendo l'efflusso diretto della sostanza dal citoplasma all'ambiente extracellulare (fig.2).



**La formazione del biofilm** porta alla formazione di microcolonie di batteri ricoperte dall'esopolisaccaride alginato (MEP) (Fig 3). Il primo evento nella formazione del biofilm è rappresentato dal processo di adesione mediato da strutture della superficie cellulare di *P. aeruginosa*, quali il flagello e strutture di tipo CUP (Chaperone Usher Pathway); nelle fasi successive la strutturazione delle microcolonie in un biofilm maturo implica l'intervento di diversi determinanti per l'espressione di alcuni geni legati al "quorum sensing", una modalità di comunicazione tra batteri basata sulla produzione di sostanze diffusibili che correlano direttamente con la densità cellulare in un determinato ambiente. Nel caso di *P. aeruginosa* la molecola segnale è l'omoserina lattone, che interagisce tramite vari attivatori trascrizionali che coordinano l'espressione di un pool di geni correlati alla virulenza e codificanti vari fattori, quali alginato, proteasi, emolisine A e pigmenti che facilitano la persistenza del batterio nel polmone (Davies *et al.*, 1998).

Il MEP rappresenta anche una barriera difensiva nei confronti di agenti antimicrobici e del sistema immunitario dell'ospite. La fagocitosi è inibita e contribuendo al processo infiammatorio e al danno polmonare. Inoltre, la lenta crescita



batterica, limitata dalla carenza di ferro all'interno del biofilm, riduce la suscettibilità batterica agli antibiotici, contribuendo in tal modo all'inabilità ad eradicare *P. aeruginosa* anche con i trattamenti antibiotici più aggressivi. **La resistenza acquisita** riguarda invece i meccanismi di resistenza che i batteri hanno acquisito in seguito a differenti meccanismi di mutazioni del DNA batterico (resistenze ad evoluzione verticale), o a mutazioni dovute a trasferimento di un gene esogeno da batteri resistenti mediante processi di: trasformazione, trasduzione o coniugazione (resistenze ad evoluzione orizzontale) (Livermore *et al.* 2002).

La resistenza legata alle mutazioni cromosomiche costituisce circa il 10% delle resistenze acquisite e solitamente riguarda un solo antibiotico. Il livello iniziale di resistenza appare estremamente basso e facilmente superabile con un aumento del dosaggio del farmaco antibatterico; questo tipo di resistenza viene definito *multi-step* in quanto sono necessarie più mutazioni successive anche se in alcuni casi (per i chinolonici e la streptomina) è sufficiente una sola mutazione (*one-step*) per ottenere effetti significativi (Goodman and Gilman's 2001).

La resistenza per trasferimento orizzontale riguarda circa il 90% delle resistenze acquisite. Non si verifica solamente tra microrganismi della stessa specie, ma anche tra specie diverse e spesso riguarda resistenze multiple; cioè la resistenza non è diretta contro un solo antibiotico ma contro più antibiotici simultaneamente. La resistenza extracromosomica, inoltre, determina un'immediata resistenza al farmaco che non è superabile alzando il dosaggio (Goodman and Gilman's 2001). I meccanismi meglio conosciuti di acquisizione della multiresistenza agli antibiotici anti-*Pseudomonas* sono quattro e sono dovuti a mutazioni che:

- attivano la produzione di AmpC  $\beta$ -lattamasi (Juan *et al.* 2005).
- riducono l'espressione della porina OprD, influenzando sulla suscettibilità ai carbapenemi (Livermore *et al.* 2001).
- alterano l'espressione dei sistemi d'efflusso

(Poole 2004)).

-causano la formazione di topoisomerasi responsabili della resistenza ai chinolonici (Akasaka *et al.* 2001).

I principali meccanismi di resistenza acquisita di *P. aeruginosa* per le 4 classi di farmaci anti-*Pseudomonas* più utilizzati ( $\beta$ -lattamici, aminoglicosidi, fluorochinolonici, polimixine) sono i seguenti:

**La resistenza ai  $\beta$ -lattamici** Il meccanismo più comune è l'incremento della produzione di AmpC  $\beta$ -lattamasi che causa ridotta sensibilità ai  $\beta$ -lattamici quali penicilline, cefemi e monobactami (Rossolini 2005).

Sono state classificate tre tipi diversi di  $\beta$ -lattamasi :

Penicillasi a spettro-ristretto che degradano le penicilline e le cefalosporine anti-*Pseudomonas*, ma non attive per i cefemi, i monobactami e i carbapenemi (Bush *et al.* 1995).

$\beta$ -lattamasi (ESBLs) ad ampio spettro che degradano penicilline, cefemi, monobactami (aztreonam), ma non i carbapenemi (imipenem e meropenem) (Bradford 2001).

Metallo- $\beta$ -lattamasi (MBL) è un tipo di resistente emergente, degradano quasi tutti i  $\beta$ -lattamici anti-*Pseudomonas* tranne i monobactami.

Gli enzimi del secondo e del terzo gruppo sono quelli clinicamente più rilevanti a causa del loro ampio spettro d'azione e sono identificati con frequenza crescente negli ambienti clinici (Bush 2001).

Le mutazioni che causano la diminuzione dell'espressione della porina OprD conferiscono resistenza all'imipenem e, in maniera ridotta, al meropenem (Rossolini 2005, Livermore 2001).

Le mutazioni che comportano l'*up-regulation* di alcuni sistemi d'efflusso possono risultare in una diminuita suscettibilità ai  $\beta$ -lattamici

**Le resistenze agli aminoglicosidi** sono dovute prevalentemente alla produzione di enzimi alterati (Poole 2005) codificati da determinanti di resistenza acquisiti per trasferimento orizzontale. Questo tipo di resistenza è dovuta all'alterazione della funzione dei seguenti enzimi: l'adenilil-trasferasi e le acetil-trasferasi (Shaw *et al.* 1993).

Le resistenze ai fluorochinolonici sono dovute alle mutazioni legate all'*up-regulation* delle pompe d'efflusso, oppure a mutazioni dei siti bersaglio delle topoisomerasi (Jalal *et al.* 2000).

Le resistenze acquisite alla colistina. La resistenza alle polimixine è molto rara, nei pazienti FC, sono state segnalate recentemente resistenze alla colistina (Hogardt *et al.* 2004). Tale resistenza sembra dovuta ad una alterazione della struttura della membrana esterna.

Le resistenze di *P. aeruginosa* ai farmaci di una determinata classe sono in genere dovute non ad un singolo fattore di resistenza, ma a vari e diversi meccanismi di resistenza che possono provocare un aumento del livello di resistenza del batterio.

La **virulenza** di *P. aeruginosa* è dovuta anche alla produzione di molti fattori (esotossina A, elastasi, proteasi alcalina, emolisine, lipopolisaccaride, pili): tossine proteiche extracellulari o di membrana che provocano una specifica risposta anticorpale subito dopo l'inizio dell'infezione; metaboliti secondari, di basso peso molecolare, che sfuggono al riconoscimento immunitario e che possono giocare un ruolo importante nell'infezione cronica; proteinasi capaci di effettuare il clivaggio delle immunoglobuline, dei componenti del complemento, della transferrina, delle citochine e dei recettori di cellule immunocompetenti.

Inoltre la patogenicità di *P. aeruginosa* è dovuta alla sua capacità di superare le barriere anatomiche, alla resistenza ad un elevato numero di antibiotici e disinfettanti, ed alla capacità di sopravvivere in molte nicchie ecologiche. Tale versatilità, può essere in parte attribuita alla alta frequenza di mutazioni spontanee cui il germe va incontro in situazioni ambientali particolari, quali la presenza di elevati gradienti di concentrazione di antibiotico e tensioni di ossigeno non uniformi, che favoriscono la selezione di ceppi ipermutabili (Oliver *et al.* 2004).

**Studi epidemiologici**, effettuati utilizzando varie metodiche di genotipizzazione, suggeriscono che la trasmissione di *P. aeruginosa* possa avvenire tramite contatto diretto tra pazienti o tramite fonti ambientali contaminate. Per tale motivo i Centri FC hanno messo a punto un programma di segregazione che prevede la separazione dei pazienti colonizzati da *P. aeruginosa* da quelli non colonizzati, allo scopo di evitare fenomeni di cross-infezione, inoltre vengono osservate misure igieniche di decontaminazione del personale medico e dell'ambiente, incluse la disinfezione di equipaggiamenti medicali e di lavandini (Saiman *et al.* 2004). Nella maggior parte dei casi il processo infettivo è sostenuto da ceppi clonali e ciascun paziente FC acquisisce un singolo ceppo di *P. aeruginosa* in modo indipendente, probabilmente da diverse fonti ambientali (Romling *et al.* 1994), tuttavia molti studi descrivono ceppi di *P. aeruginosa* altamente virulenti e trasmissibili in centri di cura FC europei ed australiani (Cheng *et al.* 1996, Anthony *et al.* 2002, Jones *et al.* 2001, Scott FW *et al.* 2004).

La colonizzazione con alcuni di questi cloni epidemici ha un impatto negativo sullo stato clinico dei pazienti (Al-Aloul *et al.* 2004).

### **Appendice tecnica**

(vedi Linee guida per l'esecuzione di campioni microbiologici dei pazienti fibrosi cistica-Gruppo di Microbiologia della SIFC)

Per l'isolamento di *P. aeruginosa* sono richiesti terreni selettivi ed consigliato l'uso di Mac Conkey Agar (o analoghi) e Agar Cetrimide (o analoghi). L'incubazione deve essere protratta oltre le 48 ore in quanto alcuni ceppi (ad esempio le varianti a colonia piccola) hanno tempi di crescita molto lenti. Dal singolo paziente si possono isolare contemporaneamente colonie con aspetto diverso (morfotipi) ognuna delle quali deve essere testata separatamente per la chemiosensibilità.

Nel caso di ceppi di *P. aeruginosa* multi o pan resistenti può essere indicato eseguire i test per le associazioni di farmaci al fine di evidenziare un eventuale effetto sinergico. L'identificazione di *P. aeruginosa* si esegue classicamente con test biochimici commerciali, tuttavia alcuni ceppi possono risultare di difficile identificazione e possono essere confusi con specie simili di gram negativi non fermentanti. La conferma dell'identificazione *P. aeruginosa* può essere effettuata con l'ausilio di tecniche molecolari, sono stati messi a punto infatti diversi metodi che sfruttano l'amplificazione di frammenti genici specifici da utilizzarsi su colonia isolata (Spilker *et al.* 2004).

### **BIBLIOGRAFIA**

- Al-Aloul M, Crawley C, Winstanley C, Hart CA, Ledson MJ, Walshaw MJ. Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax*. 2004; 59: 334-36.
- Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 2263-2268.
- Anthony M, Rose B, Pegler B, Elskins M, Service H, Thamotharampillai K, Watson J, Robinson M, Bye P, Merlino J, Harbour C. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2772-78
- Barth AL, Pitt TL. Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from protophic wild-strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 37-40.
- Bradford P. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance treat. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 933-951.
- Burns J, Gibson S, McNamara, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy, Castile R, Smith AL, Ramsey BW: Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 2001; 183: 444-452.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 1211-1233.
- Bush K. New-  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria:



- diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. 2001; 32: 1085-1089
- Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, van Saene H, Hart CA. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 2006; 348: 639-642.
  - Chernish RN, Aaron SD. Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9(6):509-15. Review.
  - Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;280(5361):295-8.
  - De Kievit T, Parkins MD, Gillis RJ, Sri Kumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DJ. Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45: 1761-1770.
  - Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics 10/e. Mc Graw Hill 2001.
  - Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*. 1996;60(3):539-74. Review.
  - Hancock RE. Resistance mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*. 1998; 27(suppl1): S93-S99.
  - Høiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros*. 2005;4 Suppl 2:49-54. Review.
  - Hogardt M, Sabine Schmoltd S, Götzfried M, Adler K, Heesemann J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54(6): 1057-1061.
  - Jalal S, Ciofu O, Høiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 710-712.
  - Jones AM, Govan JR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet*. 2001; 358: 557-58
  - Jones AM, Dodd ME, Doherty CJ, Govan JR, Webb AK. Increased treatment requirements of patients with cystic fibrosis who harbour a highly transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax*. 2002;57(11):924-5.
  - Jensen ET, Giwercman B, Ojeniyi B, Bansborg JM, Hansen A, Koch C, Fiehn E., Høiby N. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis the possible role of contamination by dental equipment. 1997; 36: 117-122.
  - Johansen HK, Høiby N. Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. *Thorax*. 1992;47(2):109-11.
  - Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4733-4738.
  - Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps, and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* . 2001; 47: 247-250.
  - Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst night-mare? *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 634-640.
  - Luzar MA, Montie TC. Avirulence and altered physiological property of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1985; 50: 572-76.
  - Martin DW, Scurr MJ, Mudd MH, Govan JR, Holloway W, Deretic V. mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl acad Sci USA*. 1993; 90: 8377-81.
  - Munck A, Bonacorsi S, Mariani-Kurdjian P, Lebourgeois M, Gerardin M, Brahimi N, Navarro J, Bingen E. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis patients with initial and subsequent colonization. *Pediatr Pulmonol*. 2001; 32: 288-92
  - Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blasquez J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implication for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 88:4226-33
  - Pedersen SS, Høiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*. 1992;47:6-13.
  - Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10: 12-26.
  - Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 479-487.
  - Romling U, Fiedler J, Bosshammer D, Grothues D, Greipel J, von der Hartdt H, Tummler B. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1994; 170:1616-21
  - Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11: 17-32.
  - Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*; 17: 57-71.
  - Scott FW, Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol*. 2004; 53: 609-15.
  - Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*. 1993; 57: 138-163.
  - Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 8487-8492.
  - Spilker TT, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 2074-9.
  - Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Döring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. 2005; 26:458-61.



# Il monitoraggio immunologico dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa*

Novella Ravenni, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze

La maggior parte dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) soffre di infezioni ricorrenti e croniche localizzate nel tratto respiratorio inferiore, che risulta così esposto ad una forte e sostenuta stimolazione antigenica, per cui l'ipergammaglobulinemia è una caratteristica comune in FC. Tale aspetto è particolarmente pronunciato nei pazienti con colonizzazione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

In una patologia cronica come la FC il sistema immunitario è inefficace nel conservare le vie aeree libere da batteri; dal momento che però esso mantiene la fisiologica capacità di reagire verso i vari microrganismi che colonizzano le vie respiratorie, la malattia infettiva cronica diventa anche una malattia infiammatoria cronica. L'infiammazione cronica e suoi prodotti solubili, così come hanno effetti benefici nel raggiungimento dell'equilibrio ospite-parassita, possono essere anche pericolosi e, nel contesto dell'FC, contribuire alla patologia polmonare: prodotti infiammatori sono infatti costantemente presenti nelle vie aeree FC ed hanno il potenziale per danneggiare non soltanto le cellule delle vie respiratorie ma anche cellule dell'infiltrato infiammatorio. Le cause di tale danno sono principalmente:

- un massivo afflusso di neutrofilii nelle vie aeree con aumento del rilascio di fattori danneggianti l'epitelio (es. elastasi)
- una reazione infiammatoria secondaria alla formazione di immunocomplessi circolanti, con manifestazioni cliniche mediate da precipitazione degli immunocomplessi stessi (es. artropatie, artriti e vasculiti cutanee leucocitoclastiche)
- una produzione di anticorpi che ostacolano il processo di opsonizzazione, rappresentando così un ostacolo alla fagocitosi

Nel caso dell'infezione polmonare sostenuta da *P. aeruginosa*, il risultato della risposta umorale si traduce in un aumento della produzione di anticorpi diretti verso il batterio, che però non viene eliminato; si determina quindi una ipergammaglobulinemia (soprattutto in pazienti cronici) (Hassan *et al.*, 1994) in cui tali anticorpi non conferiscono alcuna protezione, ma sono anzi associati ad una progressiva riduzione della funzionalità polmonare.

In FC si ipotizza quindi una disregolazione della risposta immunitaria che risulta così

fondamentale nel perpetuare uno stato infiammatorio cronico, per cui possiamo concludere che il danno polmonare non sia causato soltanto dal batterio in sé ma anche da una risposta immunomediata, a causa di una esagerata risposta infiammatoria verso *P. aeruginosa*; per tale motivo elevati titoli anticorpali possono essere considerati un marker di prognosi infausta.

Gli anticorpi prodotti verso *P. aeruginosa* si sviluppano secondo una precisa gerarchia temporale, che potrebbe riflettere la sequenziale produzione dei diversi antigeni del batterio durante lo stabilirsi dell'infezione polmonare (West *et al.*, 2002): in particolare è stato osservato che gli anticorpi anti-esotossina A e anti-fosfolipasi C sembrano svilupparsi per primi, mentre per la produzione di anticorpi anti-elastasi e anti-proteasi alcalina è necessario un tempo maggiore (Tramper-Stranders *et al.*, 2005). I titoli anticorpali aumentano durante i periodi di infezione attiva, mentre ne è stato osservata una diminuzione durante il trattamento antibiotico (Tramper-Stranders *et al.*, 2005).

Sembra inoltre che la fase assenza/ presenza del batterio e la transizione ceppi non mucoidi/ ceppi mucoidi portino ad un incremento dei titoli anticorpali, suggerendo che la risposta umorale sia strettamente correlata ai vari stadi di colonizzazione del batterio (Zhanhai *et al.*, 2006). La memoria della risposta anticorpale, specializzata nella difesa da *P. aeruginosa*, viene potenziata dalle ricorrenti infezioni da parte del batterio. Durante l'infezione con ceppi non mucoidi, i linfociti B riconoscono la presenza del germe e aumentano la produzione di anticorpi: per tale motivo i pazienti FC sviluppano una immediata ma moderata risposta immunitaria verso tali ceppi. Con la transizione al fenotipo mucoido la produzione Ab è ulteriormente potenziata (Zhanhai *et al.*, 2006). L'aumento quindi dei titoli anticorpali possono rappresentare precoci segnali delle varie fasi di colonizzazione da parte di *P. aeruginosa*.

## IgG e sottoclassi

I pazienti FC con infezione cronica da *P. aeruginosa* producono elevati livelli di specifici anticorpi diretti verso la maggior parte dei costituenti antigenici batterici, in particolare verso gli antigeni di superficie, incluso

lipopolisaccaride e alginato (Pressler *et al.*, 1994) e verso i principali fattori di virulenza, cioè proteinasi alcalina, elastasi e esotossina A. E' stato ampiamente dimostrato che le IgG prodotte da pazienti FC in risposta all'infezione da *P. aeruginosa* sono inefficaci nel mediare l'opsonizzazione e il killing del batterio (Pressler *et al.*, 1994); dal momento che il legame delle IgG anti-LPS è normale, è stato ipotizzato che tale inibizione sia dovuta ad un effetto inibitorio mediato dalla porzione Fc dell'anticorpo. Esistono 4 sottoclassi di IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) con diversa struttura, funzione e coinvolgimento nella risposta anticorpale: esse hanno infatti una diversa abilità nel promuovere il processo di fagocitosi, nell'attivazione del complemento e nel ruolo protettivo verso batteri. I pazienti cronici rispondono principalmente con produzione IgG1, IgG2 e IgG3 (Pressler, 1995): infatti *P. aeruginosa* stimola preferenzialmente la produzione di IgG2 e IgG3, ed elevati livelli di IgG2 e IgG3 riflettono un'infezione più aggressiva, che porta ad una maggiore compromissione polmonare (Pressler, 1996; Likavcanova *et al.*, 1992); è stato inoltre ipotizzato che elevati livelli di IgG3 possano contribuire al danno polmonare. Probabilmente è per tale motivo che alcuni pazienti colonizzati da *P. aeruginosa* rimangono clinicamente stabili a lungo mentre altri peggiorano rapidamente (Likavcanova, 1992). Nell'infezione cronica sono stati trovati anche elevati titoli di IgG4, anche se più bassi rispetto alle altre sottoclassi; tali anticorpi sono funzionalmente monovalenti e quindi danno luogo a piccoli complessi immuni non precipitanti che, non fissando il complemento, potrebbero in qualche modo ridurre la patologia mediata dal complemento stesso, aiutando così a conservare la funzionalità polmonare (Likavcanova *et al.*, 1992). Le varie sottoclassi di IgG forniscono quindi un ausilio nel monitoraggio della malattia polmonare. L'infezione da *P. aeruginosa* coinvolge sostanze responsabili dei processi di aderenza, colonizzazione o invasione durante fase precoce di infezione, tra questi il flagello di *P. aeruginosa* che rappresenta quindi un fattore di virulenza: è presente un singolo flagello polare costituito da 2 subunità, 2 flagelline denominate "a" e "b" in base al loro diverso peso molecolare. Tali antigeni flagellari hanno una rilevanza clinica perché sono stati trovati nel 98% dei ceppi motili in uno studio di 300 isolati clinici (Lagace *et al.*, 1995). Elevati valori di IgG anti-flagellina "a" e "b" sono stati trovati sia in pazienti con infezione intermittente che cronica. La produzione di IgG1 e IgG3 verso la flagellina di

tipo "b" è significativamente diversa tra pazienti con buona e cattiva funzionalità polmonare in quanto elevati livelli di tali sottoclassi di anticorpi sono correlati a scarsa funzionalità polmonare (Lagace *et al.*, 1995). Inoltre nel polmone FC elevati titoli di IgG1 e IgG3 possono incrementare l'attivazione del complemento, con conseguente produzione di anafilossine (C3a, C4a, C5a) che potenziando la chemiotassi dei neutrofili contribuiscono all'infiammazione polmonare, al danno tissutale mediato dal complemento e al peggioramento della funzionalità polmonare (Lagace *et al.*, 1995).

### **IgA**

Negli stadi precoci dell'infezione polmonare da *P. aeruginosa* la mucosa del tratto respiratorio è il primo sito di colonizzazione. Le IgA in questa sede hanno il compito di agglutinare i batteri, prevenirne l'adesione alle cellule epiteliali respiratorie, diminuirne la velocità di crescita, neutralizzare le esotossine ma non risultano efficaci nel processo di opsonizzazione batterica: quando la risposta umorale sostenuta dalle IgA è inadeguata nel prevenire la crescita batterica e l'adesione alla mucosa polmonare, si ha la produzione di IgG.

Il ruolo delle IgA e l'associazione tra concentrazione di IgA nel siero e progressione della malattia non sono del tutto note (Brett *et al.*, 1988). Dal momento che le IgA rappresentano l'iniziale risposta anticorpale nei confronti di una colonizzazione batterica a livello polmonare, è possibile che al momento dell'insorgenza della colonizzazione un incremento di IgA specifiche nel siero avvenga prima di un incremento delle specifiche IgG (Brett *et al.*, 1988): elevati titoli di IgA in assenza di IgG potrebbero essere indice di sola colonizzazione, senza invasione di tessuti e senza infezione, e ciò potrebbe quindi rivelarsi di particolare rilevanza per il trattamento antibiotico di pazienti nelle prime fasi di colonizzazione, quando è ancora possibile l'eradicazione del batterio (Brett *et al.*, 1990). E' noto che nell'infezione del tratto respiratorio superiore predominano le IgA, mentre in quelle del tratto inferiore predominano le IgG e dal momento che entrambe sono coinvolte nella risposta immunitaria verso *P. aeruginosa*, un confronto tra i titoli di IgA e di IgG potrebbe fornire indicazioni sulla profondità dell'infezione. Il rapporto dei titoli IgA:IgG diminuisce con il progredire dell'infezione, così che pazienti con colonizzazione intermittente hanno un rapporto dei titoli più elevato rispetto a pazienti colonizzati in modo cronico (Brett *et al.*, 1990); la presenza di un rapporto di titoli elevato

potrebbe essere indicativo di una risposta immune basata prevalentemente sulle IgA, che risultando sufficienti nel prevenire l'invasione tissutale e così che non c'è stimolo per la produzione di IgG.

Dopo trattamento eradicante avvenuto con successo, *P. aeruginosa* può essere nuovamente isolata nello stesso paziente, e sembra che la misura del titolo delle IgA possa rivelarsi migliore rispetto a quella delle IgG nel predire la presenza di nuova infezione, dal momento che si hanno elevati titoli di IgA prima della comparsa del batterio nell'esame colturale (Brett *et al.*, 1990). Il 90% dei pazienti FC produce infatti IgA prima che *P. aeruginosa* sia presente in carica sufficiente ( $10^4$ - $10^5$  CFU/ml) da essere isolata nel campione respiratorio anche se tale risposta anticorpale non previene comunque lo stabilirsi dell'infezione (Brett *et al.*, 1990); un'analisi periodica dei sieri per la ricerca di IgA anti-esotossina A, elastasi e proteasi alcalina potrebbe quindi rivelarsi utile per sospettare presenza di *P. aeruginosa* prima del suo isolamento colturale (Kappler *et al.*, 2006). Non essendo ancora stato però stabilito il reale valore diagnostico delle IgA, anche in presenza di un aumento dei titoli anticorpali, non viene somministrata alcuna terapia antibiotica se l'esame colturale risulta negativo. La ricerca delle IgA, e delle IgG, viene eseguita tramite Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): è un metodo immunoenzimatico dotato di buona specificità e sensibilità utilizzato per la ricerca di anticorpi diretti contro specifici antigeni. Gli antigeni utilizzati possono essere diversi: fattori di virulenza (elastasi, proteasi alcalina e esotossina A) o lipopolisaccaride (Brett *et al.*, 1988; Fomsgaard *et al.*, 1989). Da un'analisi dei titoli anticorpali verso gli antigeni di superficie di *P. aeruginosa* nel siero eseguita tramite tale metodica, per le IgA è stato rilevato un pattern simile a quello seguito dalle IgG: i pazienti non colonizzati hanno titoli di IgA molto bassi, i pazienti con colonizzazione intermittente hanno titoli elevati mentre quelli con colonizzazione cronica hanno titoli ancora maggiori (Brett *et al.*, 1990). Per quanto riguarda le sottoclassi di IgA, Hassan *et al.* hanno osservato una significativa riduzione dei livelli di IgA1 post trattamento, mentre in contrasto, un aumento, anche se non statisticamente significativo, dei livelli di IgA2: in seguito a trattamento antibiotico quindi i livelli di IgA1, suscettibili alle proteasi batteriche, sembrano diminuire, con un concomitante incremento dei titoli della sottoclasse IgA2, resistenti alle proteasi (Hassan *et al.*, 1994).

In conclusione la misura delle IgA potrebbe migliorare il management dei pazienti in 2 casi:

- come indicatori più precoci, rispetto alle IgG, di presenza di *P. aeruginosa* nel tratto respiratorio nei primi stadi della prima colonizzazione (Brett *et al.*, 1990)
- per predire la ricomparsa di *P. aeruginosa* nelle colonizzazioni successive al trattamento antibiotico eradicante

### **Tecniche usate nella diagnostica sierologica**

Sono stati messi a punto vari saggi per determinare i livelli di anticorpi diretti verso i principali antigeni di *P. aeruginosa* (lipopolisaccaride, esotossina A, elastasi e proteasi alcalina); attualmente però nessuna tecnica è dotata di specificità e sensibilità tali da rappresentare il metodo di riferimento per il monitoraggio di infezioni polmonari.

I valori sierologici possono variare in base al momento della colonizzazione in cui vengono ricercati gli anticorpi, sia in base alla tecnica e che al tipo di antigene usati. Gli anticorpi verso *P. aeruginosa* mostrano differenti trend di aumento durante l'infezione ed esiste una gerarchia temporale nello sviluppo di tali anticorpi: gli anticorpi anti-esotossina A e anti-fosfolipasi C sembrano svilupparsi per primi, mentre è necessario un periodo di tempo maggiore perché si abbia un aumento dei titoli anticorpali anti-elastasi e anti-proteasi alcalina (Tramper-Stranders *et al.*, 2005). Esistono anche diversi fattori che possono influenzare lo sviluppo di una risposta umorale, come ceppi di *P. aeruginosa* con fenotipo mucoide che sembrano indurre una risposta anticorpale più pronunciata rispetto a quella evocata da ceppi con fenotipo non mucoide (Brett *et al.*, 1986; Brett *et al.*, 1992).

-Risposta anticorpale nell'infezione cronica da *P. aeruginosa*: La maggior parte dei test diagnostici sierologici sono basati sulla ricerca delle IgG e pazienti colonizzati in modo cronico mostrano elevati titoli; la sensibilità e la specificità della sierologia nella colonizzazione cronica differisce sensibilmente in base ai vari metodi e ai vari antigeni usati.

La metodica utilizzata per la ricerca degli anticorpi precipitanti anti-*P. aeruginosa* è l'immunolettroforesi crociata (CIE), in cui si ricercano anticorpi diretti verso un antigene sonificato dei principali sierotipi di *P. aeruginosa* fornito dal Danish Cystic Fibrosis Center (Hoiby, 1977; Hoiby *et al.*, 1983); in tale metodica, sfruttando la doppia diffusione in gel che consente di identificare sia l'antigene che

l'anticorpo, là dove si ha l'incontro antigene-anticorpo, si forma un picco di precipitazione. E' una tecnica dotata di buon potere analitico anche se di scarsa sensibilità, non è costosa ma laboriosa, e analizza solo un numero limitato di campioni; evidenzia solo anticorpi precipitanti e non ricerca anticorpi diretti contro antigeni specifici.

Dopo la prima coltura positiva per *P. aeruginosa*, gli anticorpi precipitanti (precipitine) vengono ricercate 2 volte all'anno. Quando il numero dei picchi di precipitine è maggiore o uguale a 2, si parla di colonizzazione cronica. Dall'analisi di tre gruppi di pazienti (cronici, intermittenti e non colonizzati) è stato osservato che il numero di precipitine risulta significativamente più alto nei pazienti con colonizzazione cronica ( $13.55 \pm 9.1$ ) rispetto ai pazienti intermittenti ( $0.16 \pm 0.11$ ) o non colonizzati dal germe ( $0.16 \pm 0.08$ ) (Marianelli *et al.*, 1994).

E' ormai risaputo che esiste una correlazione inversa tra il numero delle precipitine e la compromissione polmonare e che nei pazienti cronici è presente un incremento del numero dei picchi di precipitine nel tempo: in base all'esperienza in letteratura, nei pazienti cronici sottoposti a cicli antibiotici trimestrali somministrati per via endovenosa, si assiste ad un incremento di 2.5 picchi per anno, mentre in quelli non sottoposti a tale tipo di terapia l'incremento è più alto (5 picchi di precipitine per anno) (Hoiby, 1977). In accordo con l'esperienza internazionale, nel Centro FC di Firenze, in regolare trattamento antibiotico per via endovenosa, l'incremento annuo medio di precipitine è risultato di 3.7 picchi (Marianelli *et al.*, 1994, Chiappini *et al.*, 2001).

In conclusione variazioni del numero di precipitine nel siero potrebbero rappresentare un buon marker per iniziare un trattamento antibiotico verso *P. aeruginosa* più tempestivo, che consentirebbe di prolungare quindi il periodo tra colonizzazione e infezione cronica (Trancassini *et al.*, 1996).

I valori di IgG anti-proteine batteriche totali ottenuti tramite ELISA correlano con i livelli di precipitine ricercati tramite CIE e tali metodiche mostrano una sensibilità tra il 96 e il 100% per la valutazione di colonizzazione cronica da *P. aeruginosa* (Pedersen *et al.*, 1987); la tecnica ELISA basata su un singolo antigene purificato mostra invece una sensibilità più bassa per la conferma della cronicità e risulta antigene-dipendente (Hollsing *et al.*, 1987).

Nello studio di Campana *et al.*, gli anticorpi precipitanti ricercati tramite CIE e gli anticorpi diretti verso i principali fattori di virulenza

autore	Test	sensibilità (%)
<b>Granstrom, 1984</b>	ELISA	
	- esotossina A	68
	- proteasi alcalina	73
	- elastasi	23
<b>Hollsing, 1987</b>	ELISA	
	- esotossina A	58
	- proteasi alcalina	58
	- elastasi	15
<b>Pedersen, 1987</b>	ELISA	96
	(proteine cellulari totali) CIE (Ab precipitanti)	100

*Sensibilità di ELISA e CIE per la ricerca di IgG verso diversi antigeni di P. aeruginosa in pazienti con colonizzazione cronica (Tramper-Stranders et al., 2005)*

(elastasi, proteasi alcalina, esotossina A) del batterio ricercati tramite ELISA rappresentano un buon marker di infezione polmonare cronica in quanto entrambi i metodi hanno una specificità e un valore predittivo positivo del 100%, ma dall'altra parte la sensibilità dei due test è risultata piuttosto bassa (78% e 52% rispettivamente). Il test ELISA effettuato per la ricerca di IgA e IgG anti-lipopolisaccaride ha mostrato elevata sensibilità (96%) sia per le IgA che per le IgG, ma le IgA, a causa della bassa specificità (38%), non possono essere usata per la diagnosi di cronicità (Campana *et al.*, 2005)

-Risposta anticorpale nell'infezione intermittente da *P. aeruginosa*: da studi longitudinali è noto che elevati titoli anticorpali non sono osservati solo nell'infezione cronica, ma anche negli stati precoci dell'infezione: la colonizzazione intermittente può infatti potenziare la formazione di anticorpi specifici, la cui concentrazione però, se confrontata con quella di pazienti colonizzati in modo cronico, risulta comunque più bassa. I titoli anticorpali, essendo influenzati anche dal trattamento antibiotico, possono variare: aumentano infatti durante l'infezione attiva, ma in seguito a trattamento antibiotico ne è stato evidenziato un decremento (Tramper-Stranders *et al.*, 2005).

-Risposta anticorpale in pazienti con infezione precoce da *P. aeruginosa*: La mancanza di un metodo di riferimento per la diagnosi di infezione precoce da *P. aeruginosa* pone l'attenzione sulla possibilità di utilizzo di specifici anticorpi come test aggiuntivo, che consentano quindi di effettuare un trattamento antibiotico più tempestivo. La seguente tabella mostra vari studi in cui sono presenti elevati titoli anticorpali anti-*P. aeruginosa* in pazienti con esame culturale negativo.



Autore	Test	%Ab
Brett, 1988	ELISA (proteine cellulari totali)	73
Burns, 2001	ELISA esotossina A	36
West, 2002	ELISA - esotossina A	69
	- lisato cellulare	88
	- elastasi	44

Percentuale di anticorpi anti-*P. aeruginosa* in pazienti con esame colturale negativo (Tramper-Stranders *et al.*, 2005).

I tre lavori di Brett, Burns e West mostrano la presenza di una precoce risposta anticorpale verso *P. aeruginosa* in assenza del germe nell'esame colturale del campione respiratorio, indicando che gli studi sierologici dimostrano una più elevata incidenza di infezione rispetto all'esame colturale stesso; in particolare Burns *et al.* rilevano che la comparsa per la prima volta di anticorpi anti-esotossina A e anti-proteine cellulari totali precede la prima identificazione di *P. aeruginosa* nel campione respiratorio (Tramper-Stranders *et al.*, 2005). È stato visto che un incremento di anticorpi anti-*P. aeruginosa* si può verificare anche 6-12 mesi prima che il germe venga isolato nel campione respiratorio; in generale lo sviluppo di anticorpi prima dell'isolamento del batterio si è manifestata approssimativamente nel 50-70% dei pazienti e come tale una coltura negativa non può definitivamente escludere la presenza di *P. aeruginosa* nel tratto respiratorio (Brett *et al.*, 1988; West *et al.*, 2002)

Recentemente Ratjen *et al.* hanno valutato i titoli di anticorpi diretto verso i principali fattori di virulenza di *P. aeruginosa* (proteasi alcalina, esotossina A e elastasi) tramite tecnica ELISA: alla specificità del 97.5%, il test ha mostrato la sensibilità più elevata per la ricerca di anticorpi anti-proteasi alcalina (85.4%), seguita da quella per anticorpi anti-elastasi (76.2%) e anti-esotossina A (72%). In base a cut-off di nuova definizione, titoli anticorpali positivi verso almeno uno dei tre diversi antigeni erano presenti nel 43% dei pazienti con nuova infezione da *P. aeruginosa*. Saggi longitudinali di titolazione anticorpale eseguiti prima e dopo terapia antibiotica eradicante al momento del primo isolamento del germe hanno mostrato una significativa diminuzione delle concentrazioni di anticorpi anti-proteasi alcalina e anti-esotossina A in pazienti eradicati, mentre un aumento nei casi di fallimento del trattamento eradicante (Ratjen *et al.*, 2007). In questo studio quindi il test ELISA per la ricerca di anticorpi verso elastasi, proteasi alcalina e

esotossina A ha rivelato alta sensibilità e specificità per la diagnosi di infezione precoce da *P. aeruginosa*; la sensibilità della metodica nel caso di utilizzo combinato dei tre antigeni si è rivelata comunque più elevata rispetto a quella fornita da ogni singolo antigene da solo (Ratjen *et al.*, 2007), suggerendo che l'utilizzo simultaneo di tre test ELISA ha sensibilità superiore a quella in cui viene usato un singolo ELISA.

#### **Uso diagnostico della risposta immunitaria: conclusioni**

Il dosaggio degli anticorpi è attualmente utilizzato per dimostrare la presenza di colonizzazione cronica da *P. aeruginosa*: infatti le IgG consentono una distinzione tra colonizzazione intermittente (isolamento continuo di *P. aeruginosa* nelle vie respiratorie per un periodo tempo inferiore a 6 mesi e normali livelli di anticorpi (Hoiby *et al.*, 2005) e cronica (isolamento di *P. aeruginosa* dalle vie aeree per almeno 6 mesi e/o livelli Ab superiori al valore di cut-off (Cystic Fibrosis Foundation 1998).

L'infezione da *P. aeruginosa* in FC è generalmente diagnosticata tramite esame colturale del campione respiratorio, cioè dell'escreato e del tampone faringeo nel caso di pazienti piccoli o non espettoranti: l'esame colturale rappresenta quindi il test di riferimento per identificare la colonizzazione da *P. aeruginosa*. Tale esame può però non essere sempre sufficiente per valutare la presenza del germe perché potrebbe fornire esiti falsamente negativi, per mancata crescita a causa della pressione antibiotica o per bassa carica microbica, o quando il campione respiratorio è rappresentato dal tampone faringeo; tale tipo di campione non fornisce infatti un quadro esatto della flora batterica del tratto respiratorio inferiore ed ha un più basso valore predittivo positivo e negativo se confrontato con l'escreato o il lavaggio broncoalveolare, quest'ultimo comunque di non utilizzo routinario. Anche in caso di esame colturale positivo potremmo avere difficoltà nell'isolamento del batterio, per esempio per bassa carica e/o coltura mista, o nella distinzione tra colonizzazione e infezione. In tutte queste situazioni in cui l'esame colturale da solo non è sufficiente, la diagnosi sierologica rappresenta un fondamentale e addizionale marker per poter escludere o confermare definitivamente la presenza del batterio e per definire lo stato di colonizzazione/infezione in pazienti FC.

Data l'assenza di un test specifico per la diagnosi di infezione precoce da *P. aeruginosa*,

gli anticorpi potrebbero rivelarsi utili anche per identificare il primo isolamento del germe e per poter attuare un trattamento farmacologico più tempestivo che potrebbe prolungare il periodo tra colonizzazione e infezione cronica: recenti studi mostrano che il 50-70% dei pazienti sviluppa IgA prima dell'isolamento di *P. aeruginosa* nel campione respiratorio, per cui le IgA potrebbero rappresentare un marker di infezione precoce, sia nella prima colonizzazione che in quelle successive al trattamento eradicante, e quindi consentire una precoce terapia antibiotica. Questo permetterebbe una diagnosi di infezione anche 6-12 mesi prima dell'isolamento del microrganismo nel campione respiratorio. La diagnosi sierologica potrebbe rivelarsi utile anche per valutare l'efficacia del trattamento farmacologico: infatti i titoli anticorpali diminuiscono significativamente in pazienti sottoposti a trattamento antibiotico, mentre aumentano in quei casi che non rispondono alla terapia. I test immunologici individuano quindi la variazione del titolo anticorpale e la diversa risposta anticorpale in pazienti intermittenti e cronici durante trattamento antibiotico, fornendo informazioni sulla progressione della malattia e quindi mostrando l'efficacia della terapia prima che il miglioramento clinico sia evidente.

Ancora non è stato però stabilito il reale valore diagnostico delle IgA, per cui attualmente, anche in presenza di un aumento dei titoli anticorpali, non viene somministrata alcuna terapia antibiotica se l'esame colturale del campione respiratorio è negativo; la presenza di elevati valori di IgA potrebbe comunque costituire un campanello di allarme per il clinico. Uno screening periodico dei sieri per la ricerca di IgA anti-esotossina A, elastasi e proteasi alcalina e anti-lipopolisaccaride potrebbe quindi fornire informazioni sulla presenza presintomatica di *P. aeruginosa*, sia per quanto riguarda la prima colonizzazione che per predire la ricomparsa del germe nelle colonizzazioni successive al trattamento antibiotico eradicante. Come tali le IgA si rivelerebbero degli indicatori più precoci, rispetto alle IgG, di presenza di *P. aeruginosa* nel tratto respiratorio nei primi stadi della colonizzazione.

La metodica maggiormente utilizzata sia per la ricerca di IgG e di IgA è la tecnica ELISA; sono ancora in corso studi per determinare quale sia l'antigene migliore da utilizzare nei test, ma attualmente nessun singolo antigene ha dato risultati ottimali. Dal momento però che i valori del test variano a seconda dell'antigene utilizzato, sarebbe importante l'uso di un antigene standardizzato che desse risultati

affidabili, riproducibili e compatibili tra vari laboratori. Recentemente è stato dimostrato che la sensibilità della metodica ELISA, nel caso di utilizzo combinato dei tre fattori di virulenza come antigeni (elastasi, esotossina A, proteasi alcalina) si è rivelata più elevata rispetto a quella fornita da ogni singolo antigene da solo, suggerendo che l'utilizzo simultaneo di tre test ELISA ha sensibilità superiore a quella in cui viene usato un singolo ELISA. Nonostante questo, la variabilità dei risultati sierologici ottenuti tra i diversi quadri di colonizzazione cronica/intermittente e di non colonizzazione tra i pazienti FC rimane considerevole, per cui le decisioni riguardo al trattamento antibiotico non dovrebbero essere basate sui soli dati sierologici.

### Bibliografia

- Brett MM, Ghoneim AT, Littlewood JM. Prediction and diagnosis of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: a follow-up study. *J Clin Microbiol.* 1988 Aug;26(8):1565-70.
- Brett MM, Ghoneim AT, Littlewood JM. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1986 Nov;61(11):1114-20.
- Brett MM, Ghoneim AT, Littlewood JM. Serum IgA antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1990 Mar;65(3):259-63.
- Brett MM, Simmonds EJ, Ghoneim AT, Littlewood JM. The value of serum IgG titres against *Pseudomonas aeruginosa* in the management of early pseudomonal infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1992 Sep;67(9):1086-8.
- Campana S, Cariani L, Ravenni N, Garlaschi ML, Laricchia L, Costantini D, Taccetti G. Immunological diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients: a comparison of methods. *J Cystic Fibrosis* 2005; (4) suppl 1:154.
- Chiappini E, Taccetti G, Campana S, Turchini S, Marianelli L. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibodies, circulating immune complexes, and anticytoplasm antibodies of neutrophils in patients with cystic fibrosis with and without *Pseudomonas aeruginosa* colonization. *Pediatr Med Chir.* 2001 Jan-Feb;23(1):27-30.
- Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 1997 Annual Data report. Bethesda, MD, USA. Cystic Fibrosis Foundation 1998.
- Hassan J, Feighery C, Bresnihan B, Keogan M, Fitzgerald MX, Whelan A. Serum IgA and IgG subclasses during treatment for acute respiratory exacerbation in cystic fibrosis: analysis of patients colonised with mucoid or non-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol Invest.* 1994 Jan;23(1):1-13
- Fomsgaard A, Dinesen B, Shand GH, Pressler T, Høiby N. Antilipopolysaccharide antibodies and differential diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1989 Jun;27(6):1222-9.
- Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic

- fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of Pseudomonas aeruginosa precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl. 1977;(262):1-96.*
- Hoiby N, Axelsen NH. Handbook of immunoprecipitation-in-gel Techniques. Scand J Immunol Suppl. 1983;10:1-383.
  - Høiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early Pseudomonas aeruginosa infection. J Cyst Fibros. 2005 Aug;4 Suppl 2:49-54.
  - Hollsing AE, Granström M, Vasil ML, Wretling B, Strandvik B. Prospective study of serum antibodies to Pseudomonas aeruginosa exoproteins in cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1987 Oct;25(10):1868-74.
  - Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griese M, Lang T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. Thorax. 2006 Aug;61(8):684-8. Epub 2006 Jan 31.
  - Lagacé J, Péloquin L, Kermani P, Montie TC. IgG subclass responses to Pseudomonas aeruginosa a- and b-type flagellins in patients with cystic fibrosis: a prospective study. J Med Microbiol. 1995 Oct;43(4):270-6.
  - Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. Longitudinal development of mucoid Pseudomonas aeruginosa infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. JAMA. 2005 Feb 2;293(5):581-8.
  - Likavcanova E, Lagacé J. Quantitative analysis of immunoglobulin G subclass responses to Pseudomonas aeruginosa antigens in cystic fibrosis. J Med Microbiol. 1992 Jun;36(6):437-44.
  - Marianelli L, Campana S, Taccetti G, Gabbriellini M, Dei R. Pseudomonas aeruginosa antibodies in patients with cystic fibrosis: clinical implications. Pediatr Med Chir. 1994 Nov-Dec;16(6):551-4.
  - Pedersen SS, Espersen F, Høiby N. Diagnosis of chronic Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1987 Oct;25(10):1830-6.
  - Pressler T, Jensen ET, Espersen F, Pedersen SS, Høiby N, Koch C. Correlation between specific IgG subclass antibodies to Pseudomonas aeruginosa and opsonic activity in serum from patients with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 1994 Jan;17(1):31-40.
  - Pressler T, Jensen ET, Espersen F, Pedersen SS, Høiby N. High levels of complement-activation capacity in sera from patients with cystic fibrosis correlate with high levels of IgG3 antibodies to Pseudomonas aeruginosa antigens and poor lung function. Pediatr Pulmonol. 1995 Aug;20(2):71-7.
  - Pressler T. IgG subclasses and chronic bacterial infection. Subclass antibodies and the clinical course of chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection in cystic fibrosis. APMIS Suppl. 1996;66:1-41.
  - Ratjen F, Walter H, Haug M, Meisner C, Grasemann H, Döring G. Diagnostic value of serum antibodies in early Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients. Pediatr Pulmonol. 2007 Mar;42(3):249-55.
  - Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TF. Detection of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2005 Aug;4 Suppl 2:37-43.
  - Trancassini M, De Vito D, Cimino G., Antonelli M., Quattrucci S, Cipriani P. Precipitating Pseudomonas aeruginosa antibodies and antimicrobial therapy in cystic fibrosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996 ;15:309-312.
  - West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, Splaingard MJ, Farrell PM. Respiratory infections with Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. JAMA. 2002 Jun 12;287(22):2958-67.

## **Burkholderia cepacia complex e altri Gram- negativi difficili**

*Priscilla Cocchi, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze*

Le vie aeree dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) costituiscono come è noto un habitat particolarmente favorevole alla colonizzazione da parte di svariate specie di patogeni opportunisti, e quindi allo sviluppo di colonizzazioni batteriche che portano in genere al peggioramento del quadro clinico del paziente. Le frequenti ospedalizzazioni, inoltre, rappresentano un rischio concreto di nuove colonizzazioni da parte di patogeni opportunisti che non sempre risultano facilmente identificabili.

Le vie respiratorie i pazienti affetti da Fibrosi Cistica sono soggetti alla colonizzazioni che possono divenire persistenti da parte di patogeni opportunisti e che si possono rivelare estremamente resistenti ai trattamenti antibiotici. Nel corso degli anni, probabilmente

sia grazie all'aumento dell'aspettativa di vita media, ma certamente anche grazie alla necessità di ripetute terapie antibiotiche, si è assistito alla comparsa sempre più frequente dei cosiddetti patogeni emergenti. Tra le specie che vengono frequentemente isolate da campioni respiratori prelevati dalle vie aeree di pazienti FC sono annoverate *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* complex e *Burkholderia cepacia*- like, *Burkholderia gladioli*, la patogenicità di tali microrganismi rimane sconosciuta ma sono potenzialmente in grado di peggiorare il quadro clinico del paziente. In quest'ottica è comprensibile la crescente attenzione rivolta verso queste specie batteriche.

L'impiego di terreni di crescita selettivi e test

biochimici agevola l'isolamento dei germi che colonizzano le vie aeree dei pazienti FC, ma non sempre permette di determinarne genere e specie. Nel caso in cui queste tecniche di identificazione che si basano su proprietà fenotipiche dei microrganismi non siano sufficienti, si rende necessario un approccio basato sulle tecniche molecolari che si basano sulla sola amplificazione di geni specifici, o su amplificazione e determinazione della sequenza nucleotidica di porzioni di geni.

Le metodiche di biologia molecolare permettono di valutare in tempi brevi le differenze di corredo genetico che caratterizzano le varie specie, riuscendo a distinguerle e permettendo ai microbiologi di dare una collocazione tassonomica corretta ai vari microrganismi isolati da campioni clinici. In particolare, il bersaglio molecolare scelto è una porzione del gene codificante per la subunità 16S del rRNA, già ampiamente utilizzato nel campo della filogenesi molecolare. Questo gene è presente in ogni specie batterica, la sua funzionalità è costante (gene house-keeping, cioè indispensabile alla vita cellulare), è altamente conservato, l'analisi comparativa delle sequenze di questo gene permette di costruire alberi filogenetici che stabiliscano eventuali relazioni tra specie che non risultano identificabili e specie già note. Per questo la filogenesi molecolare si è servita storicamente del gene per il 16S rRNA per ottenere un quadro attendibile dell'evoluzione e per questo è possibile servirsi di questo gene per agevolare l'identificazione dei microrganismi cosiddetti "difficili". Determinando la sequenza nucleotidica di questo gene e confrontando i dati con quelli già contenuti nelle banche dati, è possibile identificare la specie o quantomeno il genere dei batteri di interesse. La scarsa velocità di mutazione di questo gene ci regala infatti una fotografia piuttosto precisa del quadro evolutivo delle specie, che possiamo sfruttare per identificare i patogeni e utilizzare le informazioni ottenute per chiarirne il ruolo nelle infezioni cliniche.

La crescita su terreni selettivi e l'identificazione con test commerciali spesso non sono indicatori sufficienti per collocare correttamente all'interno di un genere o per determinare la specie di appartenenza di alcuni particolari microrganismi. Talvolta la mancata crescita sui terreni selettivi dedicati, o aspetto e caratteristiche morfologico-funzionali diversi da quelli abitualmente riscontrati rendono difficoltoso il processo di identificazione, impedendo di conoscere la diffusione e l'epidemiologia di questi batteri la cui

importanza nell'aggravare il quadro clinico dei pazienti rimane pressoché sconosciuta.

L'approccio molecolare ha permesso di far luce sull'identificazione di varie specie di patogeni difficili, scoprendo che non sempre i batteri di difficile identificazione appartengono al gruppo dei cosiddetti patogeni emergenti ma talvolta mostrano proprietà fenotipiche atipiche che ne impediscono una corretta collocazione tassonomica.

### ***Burkholderia cepacia* complex**

Nel panorama dei patogeni opportunisti che colonizzano le vie respiratorie dei pazienti FC, tra i più temuti a causa dell'elevato numero di antibiotici cui risultano resistenti, della facilità di contagio tra pazienti e della loro capacità di generare un rapido aggravarsi del quadro clinico del paziente, noto come *cepacia* sindrome, spiccano i membri del *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). Descritti per la prima volta da Burkholder nel 1950 come causa di marcescenza del bulbo delle cipolle, questi patogeni nei tardi Anni Settanta furono scoperti essere anche coinvolti nelle patologie respiratorie strettamente correlate al decorso clinico dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica. In un primo momento, però, questi microrganismi erano stati inseriti nel genere *Pseudomonas*, specie *cepacia*, e in questa categoria tassonomica rimasero fino al 1992, anno in cui *P. cepacia* e altre otto specie appartenenti al genere *Pseudomonas* furono attribuite al nuovo genere *Burkholderia*, facente parte della suddivisione  $\beta$  del *phylum* Proteobatteri. La tassonomia del nuovo genere ha subito considerevoli cambiamenti, fino ad arrivare a raccogliere ventidue specie nel 2001. A partire dalla metà degli Anni Novanta si cominciò a notare l'estrema eterogeneità tra gli isolati di *B. cepacia* provenienti da nicchie diverse, cosa che rendeva estremamente difficoltosa la classificazione degli isolati stessi soprattutto alla luce delle tecniche usate fino ad allora, che non sempre erano sufficientemente sensibili o specifiche. Per questo alcuni ricercatori misero a punto un metodo di classificazione basato su un tipo di approccio detto polifasico. Furono così classificati isolati provenienti sia da pazienti che da fonti ambientali come appartenenti ad almeno cinque specie genomiche o genomovar. La classificazione mediante questo tipo di approccio ha poi permesso di delineare la struttura del complex come la conosciamo adesso: formato da dieci diverse specie genomiche o genomovar, nove delle quali hanno raggiunto lo *status* di specie. L'evoluzione delle tecnologie e uno studio più approfondito hanno



permesso di determinare l'appartenenza al complex di altre specie per le quali si è in attesa di pubblicazione.

Fu evidente la necessità di un approccio tassonomico di tipo polifasico dal momento in cui la comunità scientifica si trovò ad affrontare la difficoltà di identificare chiaramente e univocamente i patogeni appartenenti al complex e non solo: appariva infatti evidente il bisogno di discriminare anche tra gli appartenenti al genere *Burkholderia* e i generi filogeneticamente più prossimi. La mancata o cattiva identificazione rimane tuttora una problematica rilevante, ed i *Burkholderia cepacia*-like, cioè le specie batteriche con caratteristiche che suggeriscono l'appartenenza al complex, devono essere sottoposti ad analisi molecolari in modo da determinarne con sicurezza la specie e prendere le misure necessarie per una corretta gestione del paziente.

La difficoltà maggiore era infatti rappresentata dall'eterogeneità fenotipica, della quale però non si riscontrava un corrispettivo dal punto di vista del genotipo, emergeva cioè una percentuale di ibridazione DNA-DNA insolitamente alta anche per organismi appartenenti alla stessa specie: valori superiori al 70%, quando invece normalmente si riscontrano valori che vanno dal 30% al 60%.

Questo tipo di approccio tassonomico rimane ancora metodo frequentemente adottato per l'identificazione degli appartenenti al complex, e si avvale appunto della combinazione di tecniche che indagano entrambi gli aspetti, fenotipico e genotipico, separatamente. La procedura prevede infatti un approccio volto a verificare le proprietà fenotipiche dei microrganismi di interesse, quindi ad esempio l'uso combinato di terreni selettivi e analisi biochimiche di routine, e successivamente test volti a verificare le analogie genotipiche per procedere infine al confronto e all'interpretazione dei risultati ottenuti. I microrganismi di interesse sono stati dunque sottoposti ad analisi del contenuto in acidi grassi della cellula, ibridazione DNA-rDNA, ibridazione DNA-DNA. Questo primo studio portò all'identificazione di cinque genomovar, tra cui *B. vietnamiensis*, che aveva già raggiunto lo status di specie. Al contempo, comunque, veniva proposto il nome *B. multivorans* per i microrganismi appartenenti al genomovar II. A seguire, hanno raggiunto lo status di specie, nell'ordine: genomovar IV, *B. stabilis*; genomovar VI, *B. dolosa*; genomovar VII, *B. ambifaria*; genomovar VIII e genomovar IX, rispettivamente *B. anthina* e *B. pyrrocinia*; ed infine il genomovar III, *B. cenocepacia*, che

risulta essere formato da quattro *lineage* distinti in base al polimorfismo del gene *recA* e identificati come III-A, III-B, III-C, III-D. E' stato recentemente descritto un ulteriore appartenente al complex: *Burkholderia ubonensis*, che risulta avere origine ambientale e posizione non ancora chiara in relazione agli altri genomovar pur rappresentando il genomovar X.

Ci si accorse ben presto però di come fossero difficili l'identificazione e la ricostruzione della storia filogenetica di microrganismi così strettamente correlati, e per di più basate su un approccio tanto impegnativo; l'interesse della comunità scientifica si volse quindi alla messa a punto di un approccio alternativo che permettesse comunque la discriminazione degli appartenenti al complex. Furono presi in considerazione due geni in particolare, storicamente utilizzati nel campo della sistematica batterica: il gene per il 16S rRNA, e il gene *recA* codificante per l'omonima proteina, il cui ruolo è essenziale nella riparazione e ricombinazione del DNA. Benché utilizzato spesso come marcatore molecolare per gli studi di sistematica batterica, nell'ambito dell'identificazione tassonomica del Bcc il gene per il 16S rRNA non permette di ottenere una separazione netta tra i genomovar, rendendo possibile solamente raggruppare in un unico profilo ARDRA gli appartenenti ad alcuni genomovar (I, III e IV) senza però distinguerli l'uno dall'altro come è invece possibile nel caso del genomovar V e del genomovar II.

Conoscendo la struttura multicromosomica propria del genoma dei membri del complex, dai primi studi effettuati su un ceppo di riferimento appartenente al genomovar I emergeva la presenza di due copie del gene *recA*, una per ogni cromosoma di maggiori dimensioni. E' stato invece dimostrato come gli appartenenti ai genomovar II, III-A, III-B e V abbiano una sola copia del gene. Questi dati rivestono un ruolo di grande importanza nello sviluppo di una strategia diagnostica alternativa allo studio di geni codificanti rDNA, basata su geni house-keeping e presenti in singola copia come *recA*, strategia che risulta preziosa nel caso di una tassonomia complessa come quella del Bcc.

E' stata quindi sviluppata una metodica che permettesse di discriminare in modo più accurato un genomovar dall'altro, basandosi sulla presenza di polimorfismi puntiformi nella sequenza nucleotidica del gene *recA*. Utilizzando quindi una coppia di primer complex-specifici, disegnati in base alla sequenza nucleotidica della prima open reading frame del gene in questione, è stato possibile amplificare un

frammento delle dimensioni di 1 kb, di cui è stata poi determinata e analizzata la sequenza nucleotidica. I dati così ottenuti hanno permesso di individuare polimorfismi puntiformi che permettessero una migliore discriminazione dei vari genomovar. I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati poi sottoposti ad analisi RFLP con quattro enzimi di restrizione, tra i quali è stato individuato in *HaeIII* il più adatto per lo scopo prefisso. I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con quelli ottenuti applicando l'approccio polifasico al medesimo panel di ceppi, ottenendo conferma della validità del metodo. L'analisi del gene *recA* ha messo in luce l'alta percentuale di similarità delle sequenze ottenute (94-95%), la presenza di "alleli" diversi per il genomovar III, la possibilità di mettere a punto test diagnostici *via*- PCR peculiari di ogni gruppo filogenetico (tranne che per quanto riguarda il genomovar I, per cui i test risultano scarsamente sensibili e specifici, e il genomovar IX per cui non è stato possibile mettere a punto un test diagnostico appropriato).

I membri del *Burkholderia cepacia* complex sono in grado di occupare svariate nicchie ecologiche, acque dolci e salmastre e la rizosfera di svariate specie vegetali. Alcuni studi dimostrano come la distribuzione delle specie del complex nel territorio italiano sia piuttosto omogenea, e come sia possibile rilevare appartenenti ad ogni genomovar in ambito ambientale. Inoltre anche i ceppi rizosferici, come quelli clinici, risultano resistenti a svariati antibiotici.

Dal punto di vista clinico, invece, in letteratura si nota la prevalenza tra gli isolati di *B. multivorans* e *B. cenocepacia*; in particolare, per quanto riguarda *B. cenocepacia* si ha la netta prevalenza dei *lineage* III-A e III-B, nessuna evidenza del III-D, mentre del III-C si conoscono solo isolati ambientali. Un recente studio italiano svolto su isolati clinici, denota la prevalenza di pazienti colonizzati da *B. cenocepacia*, in particolare dal *lineage* III-D, rispetto a *B. stabilis*, *B. pyrrocinia* e *B. cepacia* genomovar I. In rari casi è stata anche riscontrata la colonizzazione da parte di più di un *lineage* contemporaneamente. Inoltre è bassa la prevalenza di *B. multivorans*, solitamente uno dei membri del complex predominante nella colonizzazione di pazienti FC sia in Nord-Europa che in Canada. Sebbene recenti studi riportino epidemie causate da ceppi appartenenti a varie specie genomiche, i cloni epidemici di maggiore importanza risultano appartenere al genomovar III, *B. cenocepacia*. Nei primi anni Novanta si è diffuso nel Regno Unito un clone epidemico definito ET12; è stato identificato negli Stati Uniti un ulteriore clone

epidemico detto PHDC, poi diffuso in Europa. Il clone denominato ET12, che infetta un gran numero di pazienti in Canada e Regno Unito, è in grado di sintetizzare un peculiare pilus e un'adesina associata, che media l'aderenza alle cellule dell'epitelio respiratorio. Sebbene risulti importante nella patogenesi per ET12, questo peculiare fenotipo non è stato riscontrato in nessun altro clone epidemico di *B. cepacia*. Molti dei cloni appartenenti al genomovar III in grado di causare epidemie presentano anche altri marcatori genetici peculiari che invece sono assenti negli appartenenti al clone PHDC.

Quando si ha a che fare con campioni respiratori di pazienti FC è richiesto di operare innanzitutto una corretta separazione dalle altre specie, cioè dai cosiddetti germi *Burkholderia cepacia*- like, e di poter distinguere tra *B. multivorans* e *B. cenocepacia* a causa del ruolo preponderante che rivestono nell'epidemiologia del complex, sebbene anche *B. dolosa* e *B. pyrrocinia* abbiano dimostrato trasmissibilità e tutti gli appartenenti al complex debbano essere considerati trasmissibili.

#### **Altri microrganismi "difficili"**

Gli isolati clinici da campioni respiratori di pazienti affetti da Fibrosi Cistica vengono sottoposti a esame colturale, che permette di isolare i vari patogeni grazie alla crescita su terreni selettivi che ne mettono in risalto le diverse capacità metaboliche e permettono di ottenerne l'isolamento. La morfologia delle colonie e la capacità di crescere su un terreno selettivo piuttosto che su altro forniscono le prime indicazioni utili per l'identificazione dei microrganismi, che una volta isolati vengono sottoposti ad altri test che ne sfruttano le capacità metaboliche fino a consentire l'identificazione del patogeno. In commercio esistono test a gallerie che sfruttano varie proprietà metaboliche come la capacità di utilizzare o meno alcuni substrati; si ottiene un profilo biochimico che permette di identificare il batterio. Un altro tipo di test che può dare indicazioni per l'identificazione di isolati clinici è il profilo di suscettibilità agli antibiotici, spesso peculiare di un genere o specie. Nel caso in cui test basati sulle proprietà biochimiche non forniscano un risultato soddisfacente, ci troviamo di fronte ad un microrganismo difficile; studi recenti hanno riportato come sia sempre più frequente la mancata identificazione di patogeni isolati da campioni respiratori di pazienti affetti da Fibrosi Cistica. Le specie che normalmente causano maggiori problemi di identificazione, per le quali oltretutto i test in commercio forniscono risultati spesso

insoddisfacenti, appartengono al gruppo dei batteri Gram- negativi non fermentanti; in figura 1 si riporta lo schema utilizzato per identificare questo tipo di microrganismi.

Tra i microrganismi difficili sono annoverati i membri del *B. cepacia* complex si ricordano *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, *P. aeruginosa* e gli altri appartenenti al genere, gli appartenenti al genere *Ralstonia* e *Pandoraea*, ed i cosiddetti "*Burkholderia cepacia*-like", patogeni opportunisti che possono essere confusi con i membri del Bcc (*Pandorea spp*, *Inquilinus spp* *Ralstonia spp*) e *B. gladioli*.

Batteri appartenenti al genere *Pandoraea*, ad esempio, sono relativamente poco comuni nel panorama dei germi che colonizzano i pazienti FC, nei quali possono però causare infezioni, dare luogo a epidemie, e risultano spesso multiresistenti, mentre vengono isolati dall'ambiente (suolo e acque dolci).

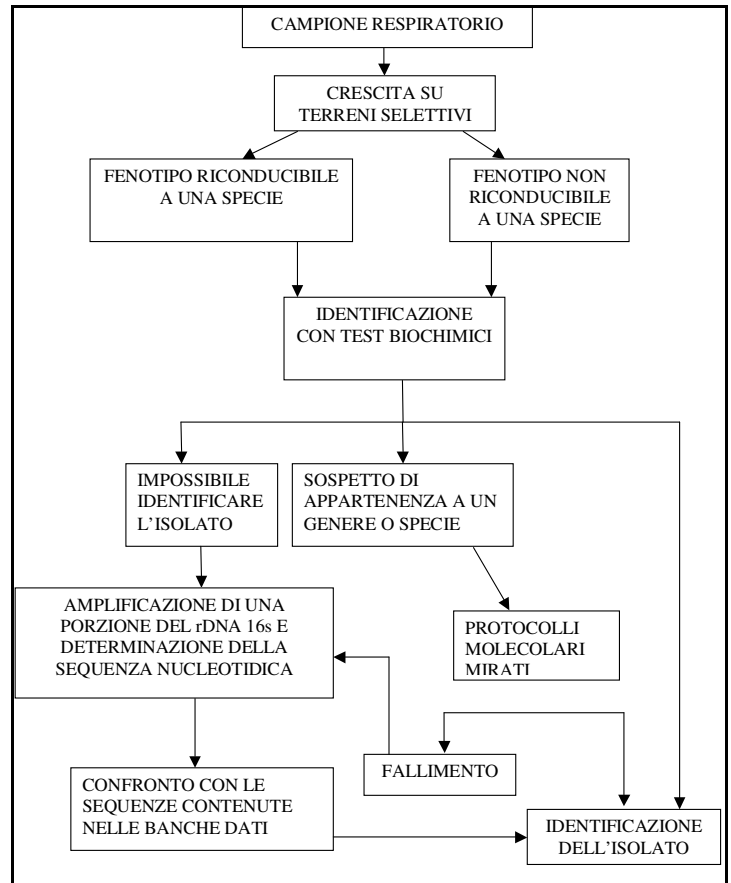
Anche gli appartenenti al genere *Inquilinus* risultano essere tra i patogeni FC meno comuni mentre vengono isolati dall'ambiente (suolo), e possono causare infezioni gravi, colonizzazioni croniche e spesso risultano multiresistenti agli agenti antibiotici.

Per quanto riguarda *A. xylosoxidans* e *S. maltophilia* sono responsabili di colonizzazioni persistenti e sono altamente resistenti ai trattamenti antibiotici. *Burkholderia gladioli* può portare allo sviluppo di ascessi, infezioni acute e serie complicazioni post-trapianto mentre non ne è riportata la capacità di cross-infezione.

E' inoltre importante ricordare come spesso possano sembrare "difficili" microrganismi la cui presenza nelle vie respiratorie di pazienti FC risulti insolita; il fatto che possano essere isolati appartenenti a generi che non sono abitualmente isolati dalle vie aeree di pazienti FC può aumentare i problemi di mancata identificazione o errori di identificazione. Sebbene la colonizzazione da parte di patogeni inusuali o difficili non abbia ancora un ruolo clinico chiaro, una conoscenza più approfondita della loro diffusione può aiutare a far luce su questa problematica, fornendo informazioni ai clinici e quindi migliorando l'assistenza verso i pazienti.

Recentemente sono stati sviluppati test molecolari *via*-PCR che utilizzano come target molecolare porzioni del gene codificante per il 16S rRNA la cui sequenza risulta peculiare di una data specie; esistono test *via*-PCR che permettono di confermare l'appartenenza di un isolato ad una data specie o ad un dato genere. Sono ad oggi disponibili protocolli per identificare *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia*, gli appartenenti al genere

*Burkholderia*, *Pandoraea*, *Ralstonia*, *Inquilinus*. Nel caso in cui non si abbiano indicazioni soddisfacenti si rende necessario amplificare una porzione più ampia del gene per il 16S rRNA e determinarne la sequenza nucleotidica per poi confrontarla con le sequenze contenute nelle banche dati e ottenere così l'identificazione del batterio.



Mapa del percorso seguito per l'identificazione di Gram-negativi non fermentanti dai campioni respiratori di pazienti FC

#### BIBLIOGRAFIA:

- Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, Giannino V, Sciacca A, and Stefani S. *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39:2891-2896.
- Atkinson RM, Lipuma JJ, Rosenbluth DB, Dunne WM Jr. Chronic colonization with *Pandoraea apista* in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence PCR. *J Clin Microbiol.* 2006 Mar;44(3):833-6.
- Ballard RW, NJ Palleroni, M Doudoroff, and R Y Stanier. Taxonomy of the aerobic *Pseudomonas*: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliiicola* and *P. caryophylli* J. *Gen. Microbiol.* 1970, 60: 199-214
- Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Chiarini L, Belli ML, Piana S, Materazzo A., Vandamme P, and Manno G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40:846-851.
- Burkholder WH. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 1950,40:115-117.



- Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Cariani L, Sciacca A, Savoia D, Collura A, Fiscarelli E, De Intinis G, Busetti M, Cipolloni A, d'Aprile A, Provenzano E, Collebrusco I, Frontini P, Stassi G, Trancassini M, Tovagliari D, Lavitola A, Doherty CJ, Coenye T, Govan JR, Vandamme P. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5136-42.
- Cheng H-P, and Lessie TG. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. *J. Bacteriol.* 1994, 176:4034-4042.
- Chiron R, Marchandin H, Counil F, Jumas-Bilak E, Freydière AM, Bellon G, Husson MO, Turck D, Brémont F, Chabanon G, Segonds C. Clinical and microbiological features of *Inquilinus* sp. isolates from five patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):3938-43.
- Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):2062-9.
- Coenye T, Liu L, Vandamme P, LiPuma JJ. Identification of *Pandoraea* species by 16S ribosomal DNA -based PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2001 Dec;39(12):4452-5.
- Coenye T, LiPuma JJ. Use of the *gyrB* gene for the identification of *Pandoraea* species. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Feb 19;208(1):15-9.
- Coenye T, LiPuma JJ, Henry D, Hoste B, Vandemeulebrouche K, Gillis M, Speert DP, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, 51: 271-279
- Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D, LiPuma JJ, Laevens S, Gillis M, Speert DP, Vandamme P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. 51:1481-1490.
- Coenye T, Spilker T, Reik R, Vandamme P, Lipuma JJ. Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3463-6.
- Coenye T, Spilker T, Van Schoor A, LiPuma JJ, Vandamme P. Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax.* 2004 Nov;59(11):952-4.
- Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *J. Clin. Microbiol*, 2001, 3427-3436.
- Eisen JA. The RecA protein as a model molecule for systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *J. Mol. Evol.* 1995, 41:1105-1123.
- Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesne G, Lenoir G, Berche P, Gaillard JL. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol.* 2002 Oct;40(10):3793-7.
- Gillis M, Van Van T, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995,45: 274-289
- Govan, J. R. W., P. H. Brown, J. Maddison, C. J. Doherty J. W. Nelson, M. Dodd, A. P. Greening, A. K. Webb. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 1993.342:15-19.
- Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoic *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60: 539-574.
- Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2001 Mar;39(3):1073-8.
- Isles A, Maclunsky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levinson H. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J. Pediatr.*, 1984, 104: 206-210
- Johnson LN, Han JY, Moskowitz SM, Burns JL, Qin X, Englund JA. *Pandoraea* bacteremia in a cystic fibrosis patient with associated systemic illness. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Sep;23(9):881-2.
- Jørgensen IM, Johansen HK, Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Vandamme P, Høiby N, Koch C. Epidemic spread of *Pandoraea apista*, a new pathogen causing severe lung disease in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* 2003 Nov;36(5):439-46.
- Karlin S, Weinstock GM, and Brendel V. Bacterial classifications derived from RecA protein sequence comparisons. *J. Bacteriol.* 1995,177:6881-6893
- Kersters K, Ludwig W, Vancanneyt M, De Vos P, Gillis M, Schleifer KH. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1996, 19: 465-477
- Lessie TG, Hendrickson W, Manning BD, and Devereux R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996,144:117-128.
- LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia* epidemiology and pathogenesis: implications for infection control. *Curr Opin Pulm Med* 1998; 4: 337-441.
- LiPuma JJ, Dulaney BJ, McMenamin JD, Whitby PW, Stull TL, Coenye T, and Vandamme P. Development of rRNA-based PCR assays for the identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37:3167-3170. *Rev.* 60:407-438.
- LiPuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, Stern RC, Stull TL. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* 1990; 336: 1094-1096.
- LiPuma JJ, Marks-Austin A, Holsclaw DS, Winnie B, Gilligan PH, Stull TS. Inapparent transmission of *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* among patients with cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis* 1994; 13: 716-719.
- LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW, Liu L, and Mahenthiralingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001,164:92-96.
- Liu L, Coenye T, Burns JL, Whitby PW, Stull TL, LiPuma JJ. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1210-3.
- Liu L, Spilker T, Coenye T, LiPuma JJ. Identification by subtractive hybridization of a novel insertion element specific for two widespread *Burkholderia cepacia* genomovar III strains. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2471-6.
- Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne KS, Radomski C, Davies EJ, AV-Gay Y, Vandamme P. DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and



- Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38: 3165-3173.
- Mahenthiralingam E, Vandamme P, Campbell ME, Henry DA, Gravelle AM, Wong LT, Davidson AG, Wilcox PG, Nakielna B, Speert DP. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33:1469-1475.
  - Manno G, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, Romano L, Giannattasio A, Chiarini L, and Bevivino A. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italian cystic fibrosis center. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42:1491-1497.
  - Mastella G. *Fibrosi Cistica. Nozioni elementari e linee guida per i medici che hanno in carico un paziente.* Verona, 1995.
  - Pegues DA, Carson LA, Tablan OC, FitzSimmons SC, Roman SB, Miller JM, Jarvis WR, and the Summer Camp Study Group. Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1994; 124: 694-702.
  - Reik R, Spilker T, Lipuma JJ. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005 Jun;43(6):2926-8.
  - Rodley PD, Römmling U, and Tümmler B. A physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain. *Mol. Microbiol.* 1995. 17:57-67.
  - Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):2074-9.
  - Speert DP. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. *Paediatr Respir Rev*, 2002; 3; 230-235.
  - Stryjewski ME, LiPuma JJ, Messier RH Jr, Reller LB, Alexander BD. Sepsis, multiple organ failure, and death due to *Pandoraea pnomenusa* infection after lung transplantation. *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):2255-7.
  - Thomassen MJ, Demko CA, Klinger JD, and Stern RC. *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis: a new opportunist. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985, 131:791-796.
  - Vandamme P, Henry D, Coenye T, Nzula S, Vancanneyt M, LiPuma JJ, Speert DP, Govan JRW, and Mahenthiralingam E. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol. Med. microbiol.* 2002, 33:143-149.
  - Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt P, Coenye T, Hoste B, Coopman J, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kertsters K, Govan J, Ursing J, Rossello-Mora R. A., Garcia-Valdes E, Lalucat J. Taxonomy note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, 45:604
  - Vandamme P, Holmes B, T. Coenye, J. Goris, Mahenthiralingam E, LiPuma JJ and Govan JRW. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.- a new twist to an old story. *Res. In Microbiol.* 2003, 154: 91- 96
  - Vandamme P, Mahenthiralingam E, Holmes B, Coenye T, Hoste B, De Vos P, Henry D, and Speert DP. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J. Clin. Microbiol.* 2000,38:1042-1047.
  - Vanlaere E, Baldwin A, Mahenthiralingam E, Dowson GC, Payne GW, Vandamme P. Proposal for five new species within the *Burkholderia cepacia* complex. 2006. Abstract IBCWG meeting, April 20- 23, Gent, Belgium.
  - Vermis K, Coenye T, Mahenthiralingam E, Nelis HJ, Vandamme P. Evaluation of species-specific *recA*-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol.* 2002 Nov;51(11):937-40.
  - Wellinghausen N, Essig A, Sommerburg O. *Inquilinus limosus* in patients with cystic fibrosis, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2005 Mar;11(3):457-9.
  - Woese RC, Fox G. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5088-5090.

## I patogeni fungini nell'infezione polmonare in FC: aspetti clinici e di diagnostica microbiologica.

Graziana Manno, Laboratorio Generale di Analisi, Sezione Microbiologia della Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini e Università degli Studi di Genova

### Funghi filamentosi

Oltre alla colonizzazione da parte di un certo numero di patogeni batterici, soprattutto *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*- complex, che rimangono la principale causa d'infezioni e riacutizzazioni respiratorie, morbilità e mortalità, numerosi funghi filamentosi possono colonizzare le vie aeree dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

Questa colonizzazione fungina delle vie respiratorie, facilitata dai frequenti e prolungati cicli di terapia antibiotica e dall'uso di corticosteroidi, può in qualche caso dar luogo ad infezioni vere; la cui frequenza aumenta in modo regolare con l'aumentare dell'aspettativa

di vita dei soggetti affetti da Fibrosi Cistica e con la possibilità del trapianto di polmoni. Tuttavia la sequenza degli eventi che seguono la colonizzazione fungina, così come i fattori predisponenti a questa sono ancora in gran parte da chiarire e sarebbero necessari studi approfonditi su un grande numero di pazienti. Tra i funghi filamentosi *Aspergillus fumigatus* rimane di gran lunga la causa più frequente di colonizzazione delle vie aeree. Altri funghi filamentosi vengono sempre di più ritrovati dalle colture d'espettorato, come *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* che possono colonizzare in modo transiente. Inoltre *Scedosporium apiospermum* (la forma asessuata di

*Pseudoallescheria boydii*) è ora riconosciuto come un'importante e pericoloso colonizzante in Fibrosi Cistica. Sono state poi isolate altre specie come *Exophiala dermatitidis* e *Scedosporium prolificans*. Ma la situazione potrebbe essere ancora più complessa, come suggerito da recenti descrizioni di due altre specie isolate da espettorati di pazienti con Fibrosi Cistica: *Penicillium emersonii* e *Acrophialophora fusispora*.

Sicuramente potrebbero esserci delle variazioni geografiche nella prevalenza di colonizzazione da parte di specie di funghi filamentosi, anche in relazione alle loro caratteristiche biologiche.

La prevalenza delle specie di funghi filamentosi e l'impatto sul decorso clinico è poco conosciuto dai microbiologi e dai clinici coinvolti nel follow-up dei pazienti con fibrosi Cistica; la percentuale di pazienti colonizzati è certamente bassa ma può essere sottostimata.

**A. fumigatus e ABPA.** *A. fumigatus* è un organismo con un ruolo importante nella degradazione dei composti organici, è ubiquitario e si diffonde nell'ambiente mediante la dispersione di spore molto piccole. *A. fumigatus* è il fungo filamentoso più conosciuto sia dai microbiologi che dai clinici; oltre che il più comune colonizzante dei pazienti con Fibrosi Cistica. Sono state riportate tuttavia differenti percentuali di frequenza dal 9% al 57% secondo gli studi.

E' noto che *A.fumigatus* in Fibrosi Cistica è causa d'Aspergillosi Broncopolmonare Allergica (ABPA) la cui frequenza nei pazienti varia grandemente dai dati della letteratura (dal 0,9% all' 11%). L'APBA è caratterizzata da un'ipersensibilità polmonare mediata da una risposta allergica al fungo. ABPA compare in circa il 10% dei pazienti con Fibrosi Cistica ed è rara nei bambini al disotto dei 6 anni d'età. L'ABPA può causare un peggioramento acuto dello stato respiratorio ed un ulteriore declino della funzionalità polmonare; senza un adeguato trattamento può progredire ad uno stato cronico ed ad una fibrosi polmonare.

L'immuno-patogenesi dell'ABPA è iniziata dai conidi d'*A.fumigatus*, che sono continuamente inalati nei bronchi e germinano *in situ*, rilasciando antigeni. Queste cellule miceliali rilasciano più di 75 differenti proteine/allergeni che scatenano la produzione di citokine e interleuchina-1, -5, -13. La risposta infiammatoria nella submucosa bronchiale causa un'eccessiva produzione di mucina, rilascio d'eosinofili, ostruzione bronchiale intermittente con atelectasie e, in qualche caso, bronchiectasie.

In Fibrosi Cistica è accettato che la diagnosi

d'ABPA debba soddisfare ad almeno a 6 dei 7 "criteri definiti da Nelson:

1. respiro affannoso
2. coltura microbiologica positiva per *A. fumigatus*
3. presenza d'infiltrati visibili nella radiografia polmonare
4. reazione positiva acuta ad *A.fumigatus* con lo skin prick test
5. elevate IgE totali
6. aumento delle IgE sieriche specifiche verso *A.fumigatus*
7. aumento delle IgG sieriche specifiche verso *A.fumigatus*

### **Altri funghi filamentosi e malattia allergica**

Sembra che anche altri *Aspergillus spp.* (non-*fumigatus*) e *Scedosporium apiospermum* possano in qualche modo causare in Fibrosi Cistica forme analoghe all'ABPA; ma ancora ci sono pochi studi ed evidenze. La diagnostica microbiologica accurata di colonizzazione fungina e l'identificazione di specie potranno dare un contributo importante in questo campo

### **Infezioni fungine invasive**

Lo sviluppo di forme invasive fungine è un'evento molto raro nei pazienti con Fibrosi Cistica : sono stati descritti casi di

- aspergilloma
- aspergillosi disseminata anche dopo trapianto polmonare
- infezioni disseminate da *S. apiospermum* dopo trapianto polmonare

L'aumento dell'utilizzo di strategie immunosoppressive, specialmente nel caso del trapianto di polmone, unitamente alle terapie anti-pseudomonas sempre più aggressive, potrebbero favorire nel futuro un aumento delle infezioni fungine comprese quelle invasive.

### **La diagnostica microbiologica**

E' importante che il laboratorio di diagnostica microbiologica della Fibrosi Cistica si trovi preparato ad un'adeguata diagnostica delle infezioni fungine. Attualmente la diagnostica microbiologica dei funghi si basa prevalentemente sull'esame microscopico diretto e sulla coltura di campioni d'espettorato. Allo stato attuale però non esiste una standardizzazione delle procedure per l'esame micologico dei campioni di pazienti con Fibrosi Cistica, non esistono raccomandazioni specifiche sui terreni di coltura, così come su i tempi e le temperature d'incubazione delle colture.

La mancanza di terreni selettivi, così come tempi d'incubazione insufficienti possono compromettere il ritrovamento di alcune specie come *S.apiospermum*, che spesso è associato

ad *A.fumigatus*, di più rapida crescita. Inoltre mancano dei metodi semplici e rapidi che permettono un'accurata e facile identificazione delle specie recentemente descritte in Fibrosi Cistica. Tutto questo può spiegare le importanti variazioni sulla frequenze riportate riguardo ad alcune specie fungine nel contesto della Fibrosi Cistica.

In attesa che siano perfezionate le linee guida a riguardo delle colture e dell'identificazione dei funghi filamentosi è utile che i microbiologi pongano attenzione a

- esaminare a livello microscopico i campioni dei pazienti con isolamento ripetuto di fungo filamentoso, in particolare se colonizzati da una specie raramente riscontrata (l'osservazione delle ife fungine mediante l'esame microscopico diretto conferma che il fungo è veramente presente nel campione e non è da considerare un contaminante).
- utilizzare un terreno con agenti selettivi (es sabouraud+cloramfenicolo +gentamicina)
- tenere in incubazione le piastre per le colture fungine per 48h e se negative tenere le piastre ed osservarle dopo altre 48 h
- identificare possibilmente a livello di genere e specie, ma obbligatoriamente a livello di genere tutti i funghi filamentosi ritrovati
- segnalare sempre nel referto clinico di funghi filamentosi ritrovati e se possibile dare un'indicazione sulla loro quantità

L'identificazione di genere e specie dei funghi filamentosi si basa sull'osservazione macroscopica delle caratteristiche della colonia fungina, i tempi di crescita, i pigmenti e la morfologia microscopica del fungo. Un buon atlante e testo di micologia possono venire validamente in aiuto, così come alcuni links utili (<http://www.aspergillus.org.uk/>  
<http://www.doctorfungus.org/>  
<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>  
<http://www.cbs.knaw.nl/Medical/defaultpage.aspx>

È sempre opportuno rivolgersi a centri di riferimento per problematiche identificative e per stage di training.

L'identificazione a livello di specie dei funghi filamentosi presenti nei campioni dei pazienti è un dato importante che il microbiologo può offrire al clinico. La segnalazione della presenza di una determinata specie fungina potrà essere valutata, ad es. nel contesto di una possibile ABPA (caso d'*A. fumigatus* ed altri *Aspergillus spp.*); potrà essere data evidenza di una colonizzazione cronica; sarà un'indicazione indispensabile nel caso di pazienti in lista di trapianto di polmone. La colonizzazione fungina potrebbe essere una causa di complicanze infettive gravi, compresa l'infezione

disseminata, quando il paziente sarà trattato con farmaci immuno-soppressori nel decorso post trapianto. La conoscenza delle specie fungine colonizzanti darà al clinico indicazioni per l'eventuale profilassi e trattamento antimicotico più adeguato. Naturalmente non è richiesto che il laboratorio di microbiologia esegua i tests di sensibilità agli antimicotici dei funghi filamentosi isolati, in quanto è il pattern di sensibilità di molte specie è noto da studi microbiologici. Alcune specie fungine possono essere altamente farmaco-resistenti *in vitro* e/o *in vivo*.

*A.fumigatus* è intrinsecamente resistente al fluconazolo ma, l'itraconazolo e il voriconazolo sono sensibili sia *in vitro* che *in vivo*;

*A.terreus* è altamente resistente all'amfotericina B sia *in vitro* che *in vivo*.

*S.apiospermum* è resistente *in vitro* a miconazolo, itraconazolo, voriconazolo e caspofungina, inoltre le MICs di amfotericina B sono spesso elevate e corrispondono ad un'inefficacia del trattamento delle infezioni.

*S.prolificans* è esistente a quasi tutti gli antimicotici disponibili.

### **Candida albicans ed altri lieviti**

*Candida spp.* (in particolare *C.albicans*) è la specie fungina più frequentemente isolata dalle colture espettorato con *A.fumigatus*. *Candida spp.* è spesso di origine da una colonizzazione mucocutanea a livello oro-faringeo, favorita dai trattamenti con antibiotici, che alterano la composizione della flora microbica e dai corticosteroidi. In qualche caso può essere presente una colonizzazione cronica bronchiale; in rarissimi casi *Candida spp.* è causa d'infezione polmonare cronica o candidosi invasiva. Spesso la colonizzazione *C.albicans* provoca una produzione di IgE specifiche e questo dato può essere un marker immunologico correlabile allo sviluppo di ABPA quando è presente anche *A.fumigatus*.

I ceppi di *C.albicans* isolati in Fibrosi Cistica sono normalmente sensibili agli azoli, in qualche ceppo, isolato da pazienti trattati con itraconazolo può svilupparsi resistenza a questo farmaco e crociata con il fluconazolo.

Dal punto di vista della diagnostica microbiologica la presenza di *Candida spp.* deve essere sempre segnalata quando è in contacolonie significativa; per quanto riguarda l'identificazione di specie può essere utile l'utilizzo di un terreno cromogenico per lieviti (es CHROMagar Candida) che è in grado di identificare morfologicamente e discriminare la *C.albicans* da altre tre specie di *Candida spp.* (*glabrata*, *krusei* e *tropicalis*). Va ricordato che in qualche raro caso ceppi identificati come *C.*



*albicans* con questi terreni, ad una successiva identificazione biochimica si sono rivelati essere *Candida dublinensis*, una specie fenotipicamente simile a *C.albicans* ma geneticamente distinta. Questa specie può essere resistente al fluconazolo.

## Bibliografia

- Hilliard T, Edwards S, Buchdahl R, Francis J, Rosenthal M, Balfour-Lynn I, Bush A, Davies J. Voriconazole therapy in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2005 Dec;4(4):215-20.
- Moss RB. Pathophysiology and immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Med Mycol.* 2005 May;43 Suppl 1:S203-6
- Tillie-Leblond I, Tonnel AB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy.* 2005 Aug;60(8):1004-13.
- Slavin RG, Hutcheson PS, Chauhan B, Bellone CJ. An overview of allergic bronchopulmonary aspergillosis with some new insights. *Allergy Asthma Proc.* 2004 Nov-Dec;25(6):395-9
- Knutsen AP, Bellone C, Kauffman H. Immunopathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2002 Jun;1(2):76-89
- Levy MB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and cystic fibrosis. *Front Biosci.* 2003 May 1;8:s579-83
- Virnig C, Bush RK. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a US perspective. *Curr Opin Pulm Med.* 2007 Jan;13(1):67-71
- Webb AK, Woolnough E. *Candida albicans* infection in adults with cystic fibrosis. *J R Soc Med.* 2006;99 Suppl 46:13-6. Review. No abstract available.
- Hagerman JK, Hancock KE, Klepser ME. Aerosolised antibiotics: a critical appraisal of their use. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006 Jan;3(1):71-86
- Saubolle MA, McKellar PP. Laboratory diagnosis of community-acquired lower respiratory tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2001 Dec;15(4):1025-45
- Elphick H, Southern K. Antifungal therapies for allergic bronchopulmonary aspergillosis in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(4):CD002204. Review.
- Nagano Y, Millar BC, Goldsmith CE, Elborn JS, Rendall J, Moore JE. Emergence of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 2007 Jul;92(7):607.
- Guignard S, Hubert D, Dupont B, Anract P, Alioua D, Guerini H, Paugam A, Dougados M. Multifocal *Scedosporium apiospermum* spondylitis in a cystic fibrosis patient. *J Cyst Fibros.* 2007 Jun 11
- Vázquez-Tsuji O, Campos Rivera T, Rondán Zárate A, Mirabal García M. Endobronchitis by *Scedosporium apiospermum* in a child with cystic fibrosis. *Rev Iberoam Micol.* 2006 Dec;23(4):245-8.
- Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, Jacobs F. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2006 May;25(5):603-7
- Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, Diouri M, Hallet JN, Bouchara JP. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):2108-14.
- Williamson EC, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJ. Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol.* 2001 Jan;39(1):47-50.
- Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalotte JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000 Jan;19(1):53-6.
- Hennequin C, Benailly N, Sully C, Sorin M, Scheinmann P, Lenoir G, Gaillard JL, Berche P. In vitro susceptibilities to amphotericin B, itraconazole, and miconazole of filamentous fungi isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Sep;41(9):2064-6.

## I micobatteri in FC

Flavio Favari, Servizio di Microbiologia, Immunologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Verona

I micobatteri sono bacilli sottili ed allungati, morfologicamente piuttosto omogenei, lunghi 1-5 µm e del diametro di 0,2-0,6 µm. La loro diffusione è ubiquitaria, si possono rinvenire nel suolo, nelle acque, nei cibi e come ospiti di diverse specie animali. Possono essere aerobi stretti o micro-aerofili, non sono nè mobili nè sporigeni e, ad eccezione di poche specie, presentano ritmi riproduttivi estremamente lenti.

La maggior parte delle proprietà che caratterizzano i micobatteri sono legate al loro elevato contenuto lipidico, che raggiunge a livello della parete cellulare, valori elevatissimi (oltre il 60% del peso secco). Questi lipidi, costituiti da cere ed esteri di acidi grassi (acidi micolici), li rendono estremamente resistenti alle aggressioni dell'ambiente e sono

fondamentali per la peculiare caratteristica dell'alcool-acido resistenza che permette ai micobatteri, una volta colorati con fucsina o fluorocromo, di non rilasciare il colorante nonostante un trattamento con acido ed alcool. I micobatteri vengono tutt'ora suddivisi secondo la classificazione di Runyon in cinque gruppi ma a livello clinico, è più utile la divisione fra M. tuberculosis complex, tipico patogeno umano e micobatteri ambientali (tutti gli altri) che danno patologia solo in alcune, particolari, condizioni di debilitazione del paziente (ma c'è ancora molto da studiare).

**Il *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)** accompagna l'uomo fin dai primordi, (sono state trovate ossa del neolitico con lesioni da MTB) e, nonostante gli svariati tentativi di eradicazione, anche ai nostri giorni, provoca un gran numero



di morti.

**I micobatteri ambientali** (atipici) sono estremamente diffusi nell'ambiente, considerati da sempre saprofiti, negli ultimi decenni sono venuti alla ribalta per il loro ruolo di patogeni umani. Ad oggi alcune specie sono già riconosciute patogeniche e pertanto trattate, mentre altre specie, seppur fortemente sospettate, necessitano di ulteriori studi.

Nei pazienti FC la letteratura descrive una incidenza del 13-15% legata soprattutto a micobatteri ambientali. Poco si sa della reale importanza che riveste la presenza di questi micobatteri nei secreti FC: sono solo germi di transito intrappolati nelle secrezioni o sono veri patogeni che vanno ad aggravare situazioni già gravi? Sicuramente c'è ancora molto da studiare, quindi per ora è importante cercarli e segnalarli al clinico... tra qualche anno avremo sufficienti dati per decidere come gestire questi germi.

La disseminazione dei bacilli è solitamente intermittente, pertanto è necessario l'invio di più campioni dello stesso paziente; qualora sia possibile (per gli escreti sempre), si consiglia l'invio di almeno 3 campioni per ciascun materiale studiato.

I materiali devono pervenire al Laboratorio quanto prima, qui vengono sottoposti a digestione delle sostanze mucose e a decontaminazione della flora associata mediante N-acetil- L- cisteina + NaOH al 3% o 5%. Si procede quindi a centrifugazione a 3800 G per 20 minuti a 4 °C, per poi colorare il materiale con fluorocromi o mediante la colorazione di

Kinyoun.

La colorazione a fluorescenza risulta vantaggiosa per la rapidità di lettura consentita dalla maggior ampiezza di campo di osservazione microscopica (400x), sia rispetto alla colorazione Kinyoun (1000x) che a quella di Ziehl-Neelsen (che andrebbe abbandonata per la sua tossicità); successivamente, per una visione morfologica, lo stesso vetrino trattato con fluorocromi può essere colorato con metodo

Kinyoun.

Il materiale concentrato e decontaminato va seminato in almeno un terreno liquido (quasi tutti i sistemi in commercio sono automatizzati e vanno tutti abbastanza bene) e su terreno solido Lowenstein-Jensen che, nonostante i tempi lunghi (6-8 settimane), riesce a recuperare anche germi particolarmente esigenti. Il materiale va comunque tenuto in osservazione per minimo 6 settimane.

L'antibiogramma va sempre eseguito per l'MTB testando i principali farmaci: Streptomycin, Isoniazide, Rifampicina, Etambutolo e Pirazinamide.

Per i chemioterapici di seconda scelta per il MTB e quelli da testare sui micobatteri ambientali riconosciuti patogeni, bisogna rivolgersi ai Centri Regionali per lo Studio dei Micobatteri.

La biologia molecolare ci viene in aiuto per l'identificazione del germe (in particolare x gli ambientali) e per una rapida identificazione del MTB direttamente sul materiale respiratorio.

## Diversi metodi per una rapida identificazione e differenziamento delle specie di micobatteri a rapida crescita (RGM) in pazienti con Fibrosi Cistica.

Lisa Cariani, Fondazione IRCCS, Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena;  
Lab Microbiologia, Centro Fibrosi Cistica, Milano.

### Tassonomia

Il genere *Mycobacterium* è il solo genere della famiglia *Mycobacteriaceae*. Il contenuto percentuale G+C del DNA delle specie del genere *Mycobacterium* (62-70%) è simile a quello degli altri batteri produttori di acidi micolici, *Nocardia* (60-69%), *Rhodococcus* (59-60%), e *Corynebacterium* (51-59%).<sup>1</sup>

Nel 1959 il botanico E. Runyon propose una classificazione che, in base alla velocità di crescita e alla cromogenia, divideva le specie di *Mycobacterium* di isolamento umano in 4 gruppi.

Gruppo I specie fotocromogene a lenta crescita

Gruppo II specie scotocromogene a lenta crescita

Gruppo III specie non cromogene a lenta crescita

Gruppo IV specie (pigmentate o non) a rapida crescita (RGM).

*M. chelonae* e *M. abscessus* per la loro velocità di crescita sono classificati nel IV gruppo.

### Caratteristiche biochimiche

*M. chelonae* e *M. abscessus* sono micobatteri non responsabili della malattia tubercolare, e appartengono al IV gruppo della classificazione di Runyon (micobatteri a crescita rapida o RGM). Bacilli polimorfi, gram positivi, asporigeni, aerobi obbligati, immobili. Sono batteri microscopicamente lunghi e stretti, o corti

e larghi. Il diametro varia da 0,2 a 0,5 µm, la lunghezza da 1 a 6 µm, qualche volta con tendenza alla diramazione (branching). A volte possono essere osservate delle forme coccoidi di circa 0,5 µm.

Le cellule prelevate da giovani colture sono fortemente alcool- acido resistenti, al contrario questa caratteristica svanisce nelle colture vecchie di oltre 5 giorni. Spesso microscopicamente le colonie sono facilmente confuse con *Corinebacterium* spp.

La temperatura di crescita è si colloca tra i 22 e i 40 ° C, (temperatura ottimale di 28°C) ma certi ceppi di *M. chelonae* non sono in grado di crescere a 37° C (Vedi Tab 1)

*M. chelonae* e *M. abscessus* crescono in meno di 5 giorni, sia sui comuni terreni per la crescita dei batteri

( Agar sangue e Agar cioccolato), sia su tutti i migliori terreni di crescita di uso corrente per i micobatteri, compreso il terreno di agar MacConkey senza l'aggiunta di cristal violetto incubato a 28° C.

Le colonie possono essere piccole, lisce e lucide, rugose o piatte, e prive di pigmentazione.

Le caratteristiche fenotipiche che ci permettono di differenziare *Mycobacterium chelonae* dal *Mycobacterium abscessus* sono poche e spesso insufficienti. *Mycobacterium chelonae* non cresce sul terreno agar MacConkey incubato a 37°C, non cresce in presenza del 5% di NaCl a 35° C, mentre questa assimila il citrato.

Dei risultati opposti sono ottenuti per il *Mycobacterium abscessus*.

Caratteristiche	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura ottimale di crescita (°C)	28	28	28	28	28	28	28	28
Crescita in terreno MacConkey a 37°C	+	-	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Morfologia delle colonie	Lisce o rugose	Lisce o rugose	Lisce o rugose	Lisce o rugose	NV	NV	NV	NV
Arylsulfatase (3 giorni)	+	+	+	+	+	+	d	+
Riduzione nitrati	-	-	+	+	+	-	d	+
Imbrunimento delle colonie in presenza di citrato- ferrico	-	-	+	+	+	-	-	+
Mannitolo***	-	-	-	-	+	-	+	+
Inositolo***	-	-	-	-	+	-	-	-
Citrato***	-	+	-	-	d	-	d	-
D-glucitolo***	-	-	-	-	+/-	-	-	-
NaCl a 35° C	+	-	+	-	+	-	-	+
Catalasi semiquantitativa****	+	+	+	+	d	-	d	-

Tabella 1: Caratteristiche differenziali dei diversi micobatteri a crescita rapida (RGM)

1) *M. abscessus*,  
 2) *M. chelonae*,  
 3) *M. fortuitum* subsp *fortuitum*,  
 4) *M. fortuitum* subsp *acetamidolyticum*,  
 5) *M. fortuitum* subsp *biovariant trois*,  
 6) *M. immunogenum*,  
 7) *M. mucogenicum*,  
 8) *M. peregrinum*

+: il 90% dei ceppi risultano positivi al test  
 -: il 90% dei ceppi risultano negativi al test  
 d: tra 11 e 89% dei ceppi risultano positivi al test  
 \*\*\*: Assimilazione  
 \*\*\*\*: formazione di bolle dall'altezza superiore ai 45 mm  
 NV: non valutato

**Habitat**

*M. abscessus* e *M. chelonae* sono dei microrganismi ampiamente distribuiti nell'ambiente in particolare nell'acqua (dei fiumi, dei laghi, del mare e delle fognature) e nel suolo.

In Norvegia, in Svezia e in Germania, *M. chelonae* è frequentemente isolato negli stagni ed è probabile che anche *M. abscessus* possa essere isolato da tali luoghi.

*M. chelonae* e *M. abscessus* resistono meglio al cloro dei batteri coliformi: sono stati isolati nelle fontanelle di acqua potabile, frequentemente isolati nel sistema di purificazione dell'acqua potabile di utilizzo domestico. Queste caratteristiche ci permettono di capire che queste specie batteriche possono sopravvivere e moltiplicarsi nelle reti idriche<sup>2</sup>.

*M. chelonae* e *M. abscessus* possono resistere ai disinfettanti come la glutaraldeide al 2 % o al cloroformio al 8%. Conferendo loro una maggior capacità di contaminare materiale medico, materiale chirurgico, materiale utilizzato per il " percing",

antiseptici, reattivi di laboratorio ( es: soluzioni di cristal violetto) e acqua distillata.

**Potere patogeno nell'uomo**

***M. chelonae***

*M. chelonae* è la specie appartenente al gruppo degli RGM più resistente ai diversi chemioantibiotici. E' coinvolto in diverse infezioni acquisite in comunità.

Le infezioni acquisite in comunità possono essere suddivise in tre gruppi:

- **Malattia polmonare;** *M. chelonae* causa molto raramente malattie polmonari croniche. In uno studio di 154 pazienti con malattia polmonare cronica causata da RGM, solo 1 dei 154 isolati fu identificato come specie *M. chelonae*.

- **Malattie disseminate:** *M. chelonae* causa tre tipi di malattie cutanee. La malattia più comune è la malattia cutanea disseminata in pazienti immunodepressi, soprattutto vengono colpiti i pazienti sottoposti a trattamenti con farmaci steroidei e chemioterapici (es:

pazienti trapiantati d'organo, con artrite reumatoide e altre malattie autoimmuni).

Infezioni da *M. chelonae* sono presenti anche in pazienti con immunosoppressione indotta da farmaci, al contrario pazienti con AIDS non sono a rischio di contrarre l'infezione.

- **Infezioni localizzate:** Un terzo tipo di infezioni causate da *M. chelonae*, sono quelle acquisite in seguito a traumi (es: celluliti, ascessi e osteomieliti).

Un altro gruppo di patologie associate a *M. chelonae* sono quelle associate alle procedure invasive.

Molto sporadicamente sono stati isolati ceppi di *M. chelonae* in ferite infette dopo procedure chirurgiche.

(es: agoaspirati, impianti di valvole cardiache contaminate, siringhe contaminate).

Altre infezioni causate da *M. chelonae* sono quelle correlate all'utilizzo di cateteri endovenosi infetti (batteriemie), infezioni dei tessuti molli, infezioni articolari, endocarditi provocate da protesi valvolari contaminate, infezioni delle cornee o per dialisi peritoneale.

Infezioni disseminate sono state osservate in soggetti debilitati, infezioni cutanee disseminate sono state osservate in pazienti con insufficienza renale o in pazienti che hanno effettuato un trapianto di rene, infezioni generalizzate a numerosi organi in pazienti immunodepressi.

Negli U.S.A l'iniezione di una soluzione iniettabile contaminata da *M. chelonae* ha provocato la formazione di ascessi in 87 pazienti in un periodo compreso tra il gennaio 1995 e il mese d'agosto 1996.

In Colombia, la formazione di ascessi in 350 pazienti sono stati attribuiti ad iniezioni di lidocaina contaminate da *M. chelonae*.

La contaminazione dei reattivi e/o dell'acqua distillata in laboratorio può essere l'origine di pseudo infezioni per contaminazione di più prelievi.

### ***M. abscessus***

Degli RGM patogeni *M. abscessus*<sup>9</sup> e *M. chelonae* sono probabilmente le specie più resistenti agli antibiotici. Come *M. chelonae*, il *M. abscessus* è coinvolto in una varietà di differenti tipi di infezioni acquisite in comunità. *M. abscessus* è ritenuto il maggior responsabile delle patologie polmonari acquisite in comunità.

Le malattie polmonari, da *M. abscessus* includono: bronchiectasie in pazienti con Fibrosi Cistica e malattie granulomatose (sarcoidosi o tubercolosi)

Secondo l'analisi di Griffith et al.<sup>3</sup> la malattia polmonare da *M. abscessus* è molto simile alla malattia polmonare da *M. avium* complex, del tipo conosciuto come bronchiectasia nodulare. Il secondo presenta un decorso lento e colpisce prevalentemente pazienti anziani di sesso femminile non fumatrici e mostra una possibile disposizione geografica.

Queste similitudini suggeriscono una patogenicità comune o una suscettibilità dell'ospite.

Ripetuti isolamenti di *M. abscessus* dal tratto respiratorio sono usualmente associati a malattia

polmonare significativa.

- **Malattia polmonare in pazienti con FC.** Molti AA hanno notato che la frequenza di ritrovamento di *M. abscessus* nel tratto respiratorio di pazienti con FC è molto maggiore che in altri pazienti. I pazienti con FC infatti sono predisposti alle infezioni delle vie aeree e parenchimali per diversi motivi come la natura della malattia e le abituali bronchiectasie associate<sup>4</sup>(probabilmente, il primo fattore di rischio). L'isolamento di altri microrganismi, quali *P. aeruginosa*, spesso mascherano l'isolamento degli RGM e l'interpretazione del loro significato clinico. Dopo *M. avium* complex, *M. abscessus* è la seconda specie più comune di micobatteri isolata dal tratto respiratorio di pazienti con FC<sup>5</sup>.

Inoltre nei pazienti FC che hanno subito un trapianto polmonare la terapia immunosoppressiva post trapianto aumenta il rischio di sviluppare un'infezione da micobatteri non tubercolari, con conseguente sviluppo di malattia polmonare da *M. abscessus*, e infezioni disseminate, quali ad esempio adeniti cervicali.

- **Malattie extrapolmonari.** Dopo *M. fortuitum*, *M. abscessus* è la specie più comune fra gli RGM ad essere isolato da campioni biologici. E' causa anche di una gran varietà di malattie extrapolmonari, ad esempio infezioni cutanee disseminate, cheratiti.

- **Malattie associate a manovre invasive.** *M. fortuitum* e *M. abscessus* sono le specie più comuni di micobatteri che causano malattie nosocomiali, associate soprattutto a infezioni di ferite chirurgiche che rappresentano il 43% dei casi clinici delle infezioni extra polmonari dovute a queste specie.

### **Indagini microbiologiche per la ricerca di *M. abscessus* e *M. chelonae* nell'espettorato di pz FC**

L'escreato va raccolto preferibilmente il mattino, o comunque a distanza dal pasto, dopo accurata pulizia con gargarismi e sciacqui del cavo orale con acqua di fonte o soluzione fisiologica.

#### **Trasporto e conservazione del campione.**

Il periodo che intercorre tra la raccolta del materiale e la semina dello stesso deve essere il più breve possibile (30-60 minuti al massimo); se ciò non fosse possibile i campioni dovranno essere conservati in frigorifero a 4°C fino al momento della semina, che non dovrà però essere eseguita oltre 6-8 ore dal momento del prelievo del campione.

#### **Fluidificazione e omogeneizzazione del campione**

E' necessario rendere fluido il nummulo perché molto viscoso e poco solubile; considerata inoltre l'eterogeneità della flora batterica e la sua inomogeneità l'escreato va omogeneizzato. Allo scopo si impiegano prodotti in grado di lasciare inalterata la vitalità dei microrganismi.

Si potrebbero utilizzare vari tipi di sostanze fluidificanti,



sono però da preferire i composti attivi sui ponti S-S delle catene polipeptidiche: tali sostanze operano una riduzione specifica e stabile dei ponti disolfuro, come il Ditiotreitolo alla concentrazione ottimale dello 0,1% in PBS pH 7,2. E' importante la sterilizzazione per filtrazione del riducente prima dell'uso. A tale scopo si usano filtri Millipore 0,45 $\mu$ . E' possibile comunque reperire in commercio il Ditiotreitolo in confezioni sterili (Sputasol).

• **Semina del campione su terreno selettivo BCSA**

Il BCSA è un terreno selettivo per la crescita di *Burkholderia cepacia* complex<sup>6</sup> particolarmente efficace nell'inibire la crescita di *P. aeruginosa* ( in particolare il fenotipo mucide), molto invasivo che facilmente copre e maschera la crescita di altri microrganismi. Tuttavia la selettività del terreno non impedisce la crescita di altri microrganismi: Micobatteri a rapida crescita, *A. xylosoxidans*, *Flavobacterium* spp e *Aspergillus* spp. Questa parziale selettività del terreno ci ha permesso di evidenziare la crescita degli RGM dopo un periodo di incubazione di 7/ 15 gg, a temperatura ambiente. Le colonie sempre piccole e prive di pigmentazione possono presentare diverso aspetto: lisce e lucide o rugose.



Foto 1: Colonie di *M. abscessus* / *M. chelonae* su BCSA agar



Foto 2: Subcolture di colonie rugose su Agar sangue



Foto 3: Subcolture di colonie lisce su Agar sangue

Agar	Tabella 2: composizione del terreno BCSA
1% lattosio 1% saccarosio Estratto di lievito 600 U/ ml polimixina B 10 $\mu$ g/ml gentamicina 2,5 $\mu$ g/ml vancomicina	

**Procedura:**

- Seminare 0,1 ml del campione precedentemente fluidificato ( rapporto 1: 1) utilizzando pipette sterili in plastica monouso.
- Distribuire omogeneamente il materiale su tutta la superficie della piastra utilizzando una spatola di vetro opportunamente sterilizzata con alcool e passata alla fiamma, o con un'ansa calibrata sterile monouso.
- Incubare a 35°C per 48 ore in atmosfera aerobia e successivamente porre le piastre a temperatura ambiente per altri 5 /15 gg.
- Nel caso di positività per RGM le colonie appaiono piccole non pigmentate, mucose o rugose biancastre dal caratteristico odore di " cantina-muffa"
- Riseminare su agar sangue tutte le colonie sospette per la successiva identificazione mediante tecniche di biologia molecolare e per la valutazione dei test di sensibilità agli antibiotici.

**Valutazione in vitro della sensibilità ai diversi chemioantibiotici**

Anche se esistono delle raccomandazioni dell'NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), non abbiamo per ora metodi standardizzati e universalmente riconosciuti per la valutazione in vitro della sensibilità agli antibiotici di *M. chelonae* e *M. abscessus*



La tecnica della microdiluzione è spesso raccomandata e sembra dia dei risultati migliori rispetto al sistema E-test.

I ceppi di *M. chelonae* e *M. abscessus* sono caratterizzati dall'aver una multiresistenza agli antibiotici.

Inoltre sono state osservate anche delle resistenze acquisite attraverso mutazioni nei confronti di amikacina e claritromicina.

I ceppi sono resistenti alla pefloxacina, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, sulfametossazolo e alle doxycycline, ma generalmente sono sensibili alla claritromicina alla azitromicina e all'imipenem. La sensibilità a linezolid è variabile a seconda del ceppo batterico, sembra inoltre che *M. abscessus* sia più resistente a queste molecole di *M. chelonae*<sup>7</sup>.

I ceppi di *M. abscessus* sono generalmente sensibili all'amikacina e alle cefoxitine, mentre i ceppi di *M. chelonae* sono generalmente resistenti.

Al contrario i ceppi di *M. chelonae* sono generalmente sensibili alla tobramicina, mentre *M. abscessus* è resistente a questo antibiotico.

La claritromicina e la tigecyclina sono gli antibiotici più attivi e utilizzati.

Le prove di sensibilità in vitro si fondano sulla dimostrazione della attività inibente svolta dall'antibiotico sul microrganismo in terreno di coltura idoneo.

### Test di sensibilità per micobatteri a rapida crescita (RGM)

Sono state descritte più di 30 specie di micobatteri a rapida crescita, ma solo tre di queste, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus*, sono, con una certa frequenza, responsabili di infezioni nell'uomo. Questi micobatteri sono resistenti alla maggior parte dei farmaci antitubercolari, mentre possono essere sensibili ad alcuni farmaci non comunemente usati nei laboratori di micobatteriologia. L'approccio da usare per il saggio di sensibilità e l'interpretazione dei risultati, sono più simili a quelli relativi agli altri batteri aerobi che non a quelli relativi ai micobatteri a lenta crescita.

Per i test di sensibilità dei micobatteri a rapida crescita sono stati descritti quattro metodi: agar diluizione, agar diffusione, microdiluzione in brodo ed E-test; nessuno di questi metodi è stato tuttavia approvato dal NCCLS. Per la semplicità di esecuzione e per la buona correlazione con i metodi convenzionali il metodo E-test, che tuttavia necessita di ulteriori valutazioni, può trovare un facile inserimento nel laboratorio di microbiologia.

### Principio

E-test è un metodo quantitativo per la determinazione della sensibilità ai farmaci consistente in una sottile striscia di plastica inerte e non porosa che presenta su una faccia una scala di lettura graduata mentre sull'altra faccia è immobilizzato, in un gradiente

FARMACO	Sensibili	Moderatam. sensibili	Resistenti
Amikacina	≤ 16	32	≥ 64
Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Levofloxacina	≤ 2	4	≥ 8
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Trimetoprim-sulfametossazolo	≤ 2/32	-	≥ 4/64
Azitromicina	≤ 0,5	1	≥ 2
Linezolid	≤ 8	16	> 32
Tobramicina	≤ 4	8	≥ 16
Tigecidina	≤ 2		

Tabella 3: Criteri interpretativi dei valori di MIC (mg/ml)

esponenziale predefinito, il farmaco essiccato e stabilizzato.

Quando la striscia E-test viene applicata sulla superficie inoculata di una piastra, il passaggio del farmaco dal supporto di plastica alla matrice agarizzata è immediato e un gradiente esponenziale continuo del farmaco si forma direttamente sotto la striscia di supporto.

Dopo l'incubazione, quando la crescita micobatterica si rende visibile, si può osservare un alone di inibizione ellittico, centrato lungo la striscia di plastica. Il valore di MIC, espresso in µg/ml, viene letto nel punto di intersezione tra il bordo dell'ellisse di inibizione e la striscia di E-test.

### Reagenti

- Strisce di E-test (AB-Biodisk) con i diversi farmaci
- Piastre di 7 H 11 Agar (AB-Biodisk): terreno per le prove di sensibilità dei micobatteri

### Procedimento

- Trasferire, con un'ansa sterile, 1 o 2 colonie in una provetta con tappo a vite contenente acqua distillata sterile, ed omogeneizzare al vortex.
- Misurare la torpidità della sospensione che deve risultare di 0,5 McFarland.
- Inoculare uniformemente la superficie della piastra di 7 H 11 Agar con la sospensione batterica, usando un tampone di cotone sterile.
- Applicare le strisce E-test ed incubare le piastre in aerobiosi a 35°C per tre giorni in giare umidificate.
- Interpretare le MIC in base alle indicazioni della tabella 5.
- Refertare le MIC e le relative interpretazioni.

### Controllo di qualità

Il *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) può essere utilizzato per verificare l'attività dei diversi farmaci ad eccezione della claritromicina per la quale si è dimostrato più attendibile il *Mycobacterium chelonae* (ATCC 14472).

### Tecniche di biologia molecolare

Diversi metodi basati sull'amplificazione PCR di specifiche porzioni di genoma batterico sono stati proposti per il rilevamento e l'identificazione (o differenziazione) di specie di micobatteri.

Questi metodi si differenziano essenzialmente per il tipo di tecnica utilizzata per l'analisi del frammento amplificato.

Le principali tecniche di biologia molecolare utilizzate sono:

- PRA ( PCR Restriction Analysis)
- Genotype® Mycobacterium CM (ibridazione con sonde specifiche adese ad una membrana)
- Sequenziamento del gene 16 S rRNA.
- INNO LiPA Mycobacteria (Innogenetics, Ghent, Belgium)

Nel nostro laboratorio l'identificazione degli NTM ( Micobatteri non tubercolari) viene eseguita mediante le tecniche PRA e Genotype® Mycobacterium CM.

In un caso, all'amplificazione segue un'analisi di restrizione (PRA), nell'altro una ibridazione con sonde specifiche. L'analisi di restrizione è più complessa e poco costosa ed è preferibile come tecnica "home made". L'ibridazione con sonde specifiche è più semplice ma costosa e si presta meglio ad essere utilizzata per le metodiche commerciali preconfezionate (kit). L'analisi di restrizione è stata applicata a diverse porzioni di geni altamente conservati come *hsp65* e *rpoB* o il 16 S rDNA per la rapida differenziazione di isolati clinici strettamente correlati come *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. chelonae* e *M. abscessus*.

### PRA

Per identificare i sospetti micobatteri RGM isolati sul BCSA è stata scelta una porzione di 342 bp della sequenza del gene codificante per la subunità β della RNA polimerasi (*rpoB*). Tale gene è infatti descritto in letteratura essere in grado di differenziare il gruppo dei micobatteri tubercolari da quello dei non tubercolari (NTM) e dei micobatteri a lenta crescita da quello dei micobatteri a rapida crescita.

Il prodotto di amplificazione è stato analizzato mediante l'uso dei seguenti enzimi di restrizione: *Hind II*, *Mva I*, *AccII*, *HaeIII*. ( Vedi schema successivo).

Preliminarmente l'analisi di restrizione con *Hind II* è necessaria per discriminare i micobatteri tubercolari da quelli NTM. I micobatteri a rapida crescita sono stati differenziati da quelli a lenta crescita mediante il analisi del profilo di restrizione ottenuto utilizzando l'enzima *HaeIII*.

- *HaeIII* taglia specificatamente la sequenza di *rpoB* amplificata originando dei frammenti di DNA che, nel caso dei micobatteri a rapida crescita, comprendono frammenti lunghi 61 bp o di 201 bp (o entrambi).
- *Acc II* viene utilizzato per discriminare *M. abscessus* (207bp, 79bp) da *M. fallax* (137 bp, 79bp).
- *Mva I* identifica definitivamente *M. chelonae* nel cui

amplificato non trova siti di restrizione (342 bp).

Come controllo, è stato utilizzato un ceppo di *M. smegmatis* della collezione dell'Istituto di Microbiologia dell'Università di Milano.

### Estrazione del DNA

Il test non può essere impiegato per rilevare i micobatteri direttamente dal campione biologico, si utilizzano come campioni di partenza le colonie batteriche cresciute su terreno solido (es: Agar Sangue oppure Lowenstein-Jensen).

1. Raccogliere i batteri con un'ansa e risospenderli in 300µl di acqua sterile.
2. Incubare la sospensione a 95°C in blocco termico o bagno termostato.
3. Incubare per 15 minuti in un bagno ultrasonico.
4. Centrifugare la sospensione per 5 minuti a 5000-6000 x g (7500-8000 rpm) e utilizzare direttamente 5 µl del surnatante per la PCR.

Nel caso non sia possibile processare subito il campione trasferire il surnatante in una provetta, e conservarlo a - 20°C.

### Amplificazione

Preparare la mix di amplificazione

Per ogni campione miscelare:

- 2.5 mM di soluzione MgCl<sub>2</sub> .
- 50 mM KCl
- 10 mM Tris HCl (pH 8,3)
- 20 pmol primers (Forward e Reverse)
- 250 µM per ogni dNTP
- 1-2 Unità di Taq polymerase termostabile
- x µl di acqua sterile per biologia molecolare. La quantità aggiunta deve portare ad un volume finale della mix di 50 µl.
- Aggiungere 5-10 µl di soluzione di DNA (50 ng) estratto.

NB: le concentrazioni dei buffer possono variare molto a seconda della DNA polimerasi utilizzata.

### Protocollo di amplificazione:

95° C per 5 min - 1 ciclo (variabile a seconda della polimerasi utilizzata)

95° C per 45 sec

60° C per 30 sec - 35 cicli

72° C per 45 sec

72° C per 8 min - 1 ciclo

Controllare la dimensione del materiale amplificato su gel di agarosio al 2,5 % usando un marcatore di peso molecolare (DNA ladder) con scala da 50 bp.

Al termine proseguire immediatamente con la fase di digestione (condizioni d'uso in relazione alle istruzioni riportate dalla ditta fornitrice) o conservare gli amplificati a 4° C o a -20° C.

Verificare l'avvenuta digestione mediante elettroforesi su gel di agarosio al 4% , corsa a 100V per ≈25 min. Utilizzare un DNA-ladder da 25bp come marcatore di peso molecolare.

Per ulteriori dettagli riguardanti la sequenza dei primers e le condizioni di digestione fare riferimento agli articoli:

- "Differentiation of Mycobacterial Species by PCR-Restriction Analysis of DNA (342 Base Pairs) of the RNA Polymerase Gene (rpoB)" Bum-Joon Kim, et al., *J. Clin. Microbiol*, June 2001, p. 2102–2109.

- "Comparative Evaluation of Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis: Two Amplified Targets, hsp65 and rpoB, for the Identification of Cultured Mycobacteria". W. Cheunoy et al, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2005, 165-171.

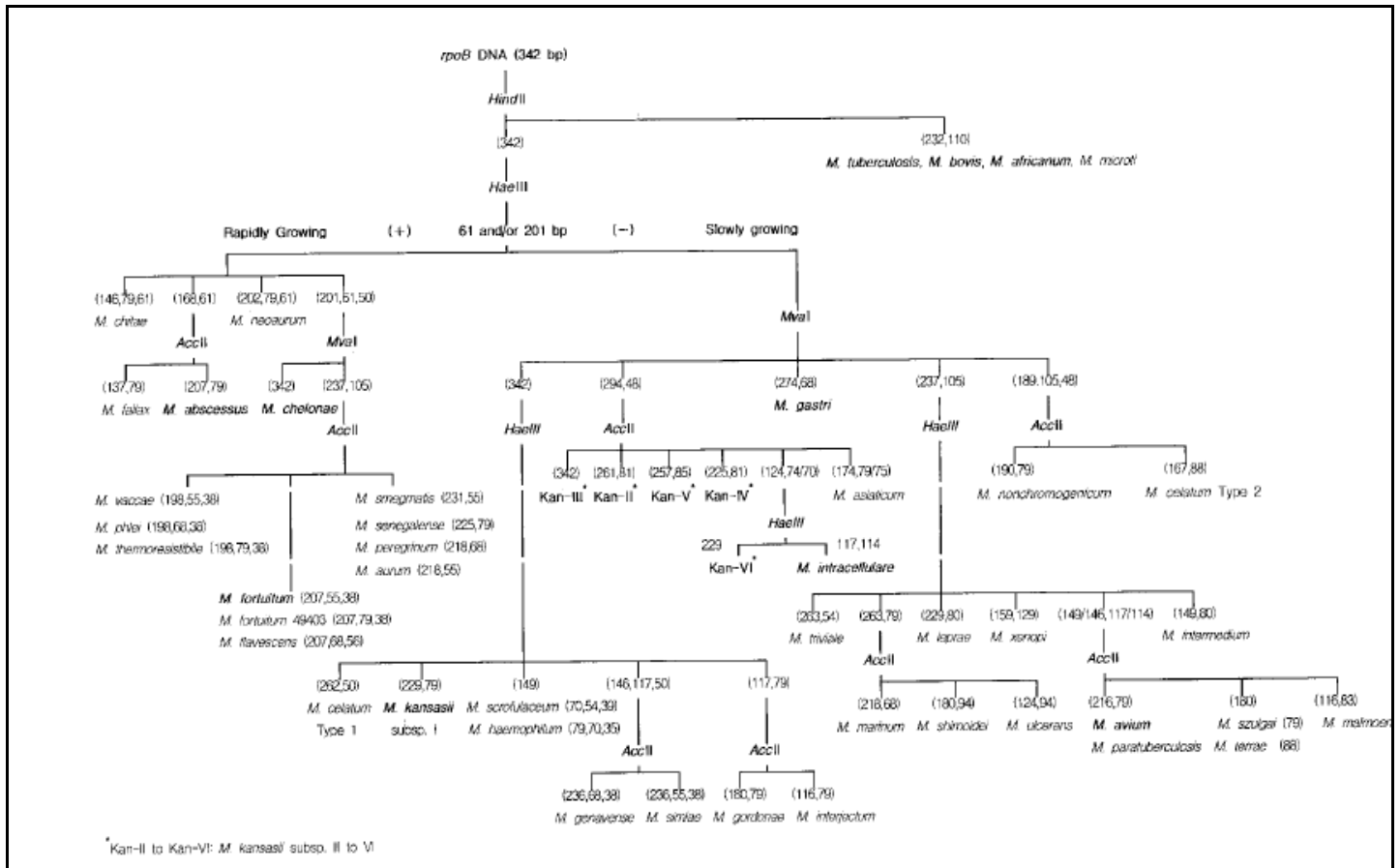


Figura 4: Schema interpretativo per l'identificazione dei micobatteri mediante PRA utilizzando gli enzimi di restrizione *HaeIII*, *HindII*, *MvaI*, and *AccII* (Bum-Joon Kim, et al., *J. Clin. Microbiol*, June 2001, p. 2102–2109)

### Genotype® Mycobacterium CM

L'analisi genetica molecolare per l'identificazione della specie di micobatteri si basa sull'ibridazione della sequenza intergenica 16 S - 23 S amplificata mediante PCR con 15 sonde specifiche fissate su una membrana.

Le sonde specifiche permettono l'identificazione delle seguenti specie di micobatteri<sup>8</sup>:

*M. avium ssp.*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. tuberculosis complex* e *M. xenopi*, *M. interjectum*.

L'intera procedura può essere suddivisa in tre fasi successive:

- estrazione del DNA da colonie batteriche ( i reattivi necessari non sono forniti)
- amplificazione mediante primers biotinilati
- rivelazione mediante Reverse Hybridization. Quest'ultima fase prevede tre passaggi successivi: la

denaturazione chimica dei prodotti amplificati, l'ibridazione degli ampliconi biotinilati a singola elica con le sonde specifiche adese ad una membrana, un lavaggio stringente, l'aggiunta di un coniugato streptavidina/fosfatasi alcalina e infine di un substrato enzimatico cromogeno specifico per la fosfatasi alcalina.

Una striscia di riferimento fornita nel kit permette la facile e rapida interpretazione dei pattern di bande ottenute.

### Estrazione del DNA

Vedere pag 34

### Amplificazione

Preparare la mix di amplificazione (45 µl per ogni campione).

Per ogni campione miscelare:

- 35 µl di mix di Primers e nucleotidi (PNM).
- 1-2 Unità di Taq polymerase termostabile

(consigliata Hot Start Taq Polymerase, Quiagen. Non fornita nel kit).

- 5 µl di tampone specifico per la Taq, concentrato 10 X (non fornito).
- x µl di soluzione MgCl<sub>2</sub> (non fornito).
- y µl di acqua sterile per biologia molecolare. La quantità aggiunta deve portare ad un volume finale della mix di 45 µl.
- Aggiungere 5 µl di soluzione di DNA estratto fino ad un volume finale di 50 µl.

Per il controllo negativo aggiungere, 5 µl di acqua sterile invece della soluzione di DNA.

### **Protocollo di amplificazione:**

95° C per 5 min - 1 ciclo

95° C per 30 sec

58° C per 2 min - 10 cicli

95° C per 25 sec

53° C per 40 sec - 20 cicli

70° C per 40 sec

70° C per 8 min - 1 ciclo

E' possibile verificare l'avvenuta reazione di amplificazione mediante elettroforesi dei campioni su gel di agarosio al 2%. La lunghezza dell'amplificato è di circa 200 bp.

Al termine proseguire immediatamente con la fase di rivelazione o conservare gli amplificati a 4° C o a -20° C.

### **Rivelazione mediante Reverse Hybridization**

Preriscaldare a 45° il bagno termostato dotato di agitatore; il massimo scarto tollerato è di  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Preriscaldare prima dell'uso la soluzione di ibridazione (HYB) e la soluzione di lavaggio stringente (STR) a 37-45°C. I reattivi al momento dell'uso devono essere privi di precipitati, eventualmente miscelarli bene. Portare tutti gli altri reattivi a temperatura ambiente, ad eccezione del coniugato concentrato (CON-C) e del substrato concentrato (SUB-C). Diluire 1:100 il coniugato concentrato (CON-C) e il substrato cromogeno concentrato (SUB-C) nei rispettivi tamponi di diluizione (CON-D e SUB-D) in base ai volumi richiesti. Miscelare bene e portare a temperatura ambiente. Calcolare 1 ml di reagente diluito per ogni striscia da testare, quindi diluire 10 µl di reagente concentrato in 1 ml di tampone.

1. Dispensare 20 µl di soluzione di denaturazione (DEN) nell'angolo della vaschetta previsto per il test.
2. Aggiungere 20 µl di campione amplificato, miscelare bene col puntale e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. Nel frattempo estrarre con una pinzetta le strisce e numerarle con una matita al di sotto della linea apposita.
3. Aggiungere 1 ml di Tampone di ibridazione (HYB) pre-riscaldato in ogni canale utilizzato. Agitare la

vaschetta fino a rendere la soluzione omogeneamente colorata.

4. Con le pinzette porre le strisce nei canali da utilizzare. Le strip devono essere completamente immerse nella soluzione e con il lato su cui sono adese le sonde rivolto verso l'alto.
5. Porre la vaschetta su un agitatore all'interno di un bagno termostato e incubare per 30 m a 45° C. Regolare in modo appropriato la frequenza dell'agitatore per miscelare la soluzione in modo completo e costante.
6. Aspirare ed eliminare completamente il Tampone di ibridazione.
7. Aggiungere 1 ml di soluzione di lavaggio stringente (ST) ad ogni striscia e incubare per 15 minuti a 45° C sull'agitatore nel bagno termostato.
8. Eliminare completamente il Tampone di lavaggio stringente prime rovesciando la vaschetta in un contenitore per i rifiuti e poi battendola gentilmente su carta assorbente. Questo procedimento si applica ad ogni fase di lavaggio.
9. Lavare ogni strip con 1 ml di soluzione di risciacquo (RIN) per 1 minuto su un agitatore a temperatura ambiente. Eliminare poi la soluzione rovesciando la vaschetta.
10. Aggiungere 1 ml di coniugato diluito ad ogni strip e incubare per 30 minuti su un agitatore a temperatura ambiente.
11. Rimuovere completamente il coniugato e lavare le strip due volte per 1 minuto con 1 ml di soluzione di Risciacquo (RIN) e una volta per 1 minuto con 1 ml di acqua distillata su un agitatore a temperatura ambiente. Eliminare ogni volta il liquido rovesciando la vaschetta.
12. Aggiungere 1 ml di substrato cromogeno diluito ad ogni strip e incubare al buio senza agitare. Il tempo di incubazione può variare da 3 a 20 minuti in funzione delle condizioni ambientali.
13. Fermare la reazione lavando brevemente con acqua distillata per due volte.
14. Utilizzando le pinzette rimuovere le strip dalla vaschetta e lasciarle asciugare fra due strati di carta assorbente.

### **Valutazione e interpretazione dei risultati**

Incollare le strip sulla scheda di valutazione apposita fornita nel kit, le bande del coniugato (CC) e controllo universale (UC) con quelle di riferimento riportate sulla scheda stessa. Segnalare nella penultima colonna della scheda le bande positive di ogni campione e indicare nell'ultima colonna il nome della specie determinata con l'aiuto dello schema interpretativo allegato. Anche la strip di riferimento fornita nel kit serve come aiuto per la valutazione e deve essere allineata sulla scheda come le strisce dei campioni.

Conservare le strip al buio.

Ogni strip possiede 17 zone reattive, evidenziabili come bande.



### Controllo del coniugato ( CC)

Lo sviluppo di questa banda sulla strip conferma l'efficacia del legame di coniugato e della reazione cromogena.

### Controllo universale (UC)

Questa banda è specifica per tutti i micobatteri noti e per il gruppo di batteri Gram positivi con un elevato contenuto di G+C nel Genoma.

Se si osserva la comparsa di questa banda e di quella del coniugato, ma il profilo della striscia non è correlabile a nessuna delle specie indicate, sono

necessari metodi addizionali o alternativi per identificare la specie in oggetto.

Solo le bande che hanno intensità uguale o superiore a quella del Controllo universale devono essere prese in considerazione per l'identificazione della specie.

### Controllo del Genere(GC)

La comparsa di questa banda documenta la presenza di un membro appartenente al genere Mycobacterium

### Bande 4-17

Bande specifiche per l'identificazione della specie (vedi schema interpretativo).

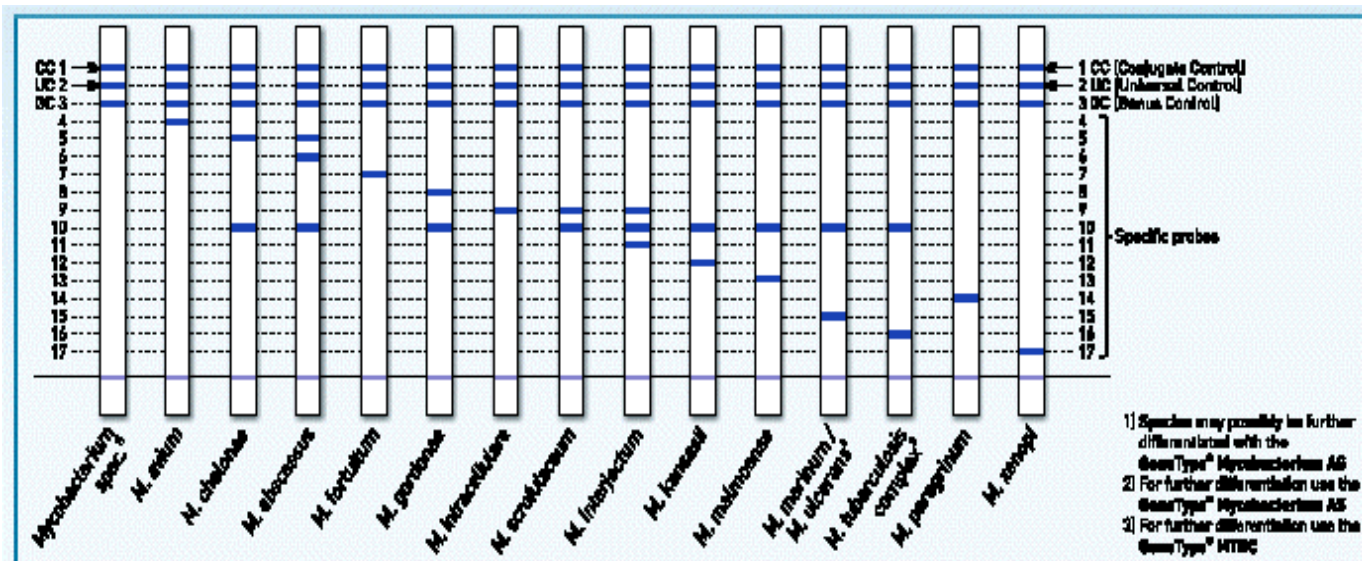


Fig. 1: Reaction zones of GenoType® Mycobacterium CM

### SEQUENZIAMENTO DEL GENE 16 S rRNA

Vedere articoli di riferimento:

- Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species. Cristina Russo, Enrico Tortoli et al, *J Clin Microbiol*, 2006, 334-339.
- PCR Assay Based on DNA Coding for 16 S rRNA for Detection and Identification of Mycobacteria in Clinical Sample. L.F.F. Kox et al, *J Clin Microbiol*, 1995, 3225-3233

### INNO LiPA Mycobacteria , (Innogenetics, Ghent, Belgium)

- Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures. Elvira Richter, et al. *J Clin Microbiol*, 2006, 1769-1775.

### Bibliografia:

- 1 .Bojalil, L. F., and J. Cerbón. 1961. Taxonomic analysis of nonpigmented, rapidly growing mycobacteria. *J Bacteriol.* 81:338-345.
- 2 .Fisheder (R.), Schulze-Röbbecke (R.) Et Weber (A.) : Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zbl. Hyg.,* 1991, 192, 154-148.

- 3 . Griffith, D. E., W. M. Girard, and R. J. Wallace, Jr. 1993. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: analysis of 154 patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147:1271-1278.
- 4 .Fauroux, B., B. Delaisi, A. Clément, C. Saizou, D. Moissenet, C. Truffot- Pernot, G. Tournier, and H. Vu Thien. 1997. Mycobacterial lung disease in cystic fibrosis: a prospective study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16:354-358.
5. Sanguinetti, M., F. Ardito, E. Fiscarelli, M. La Sorda, P. D'Argenio, G. Ricciotti, and G. Fadda. 2001. Fatal pulmonary infection due to multidrug- resistant *Mycobacterium abscessus* in a patient with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 39:816-819.
6. Henry, D., Campbell. M. et al....*Journal of Clinical Microbiology*, Apr 1999, pg 1004-1007.
- 7.Wallace. R.J., Wilson. R.W et al.... *Activities of Linezolid against Rapidly Growing Mycobacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Mar. 2001, 764-767.
8. Cristina Russo, Enrico Tortoli, et al. *Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species.* *J. Clin. Microbiol* 2006: 334-339.
9. *Mycobacterium abscessus: an emerging rapid – growing potential pathogen.* *B. Petrini Review APMIS* 114: 319-328, 2006

## Modello organizzativo di un Laboratorio per la Fibrosi Cistica

Ersilia Fiscarelli e Francesco Callea, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Ospedale Bambino Gesù, Roma

### Razionale

Nell'ambito di un progetto di "Clinicizzazione dei Laboratori" in atto presso il Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio dell'Ospedale Bambino Gesù di Roma, la Fibrosi Cistica è stata proposta come modello. La "Clinicizzazione dei Laboratori" è una esigenza della Moderna Medicina che è caratterizzata dallo straordinario sviluppo tecnologico delle scienze biomediche di questi ultimi anni e dalla caduta dei muri tra scienza di base e scienza clinica. E' emersa una reciproca interdipendenza tra ricerca scientifica, didattica, assistenza clinica e servizi di laboratori, ovvero tra campi e funzioni che prima erano relativamente indipendenti e strettamente definiti.

In questo nuovo scenario, sia il clinico sia il medico di laboratorio (patologo, microbiologo, genetista,..) sono chiamati a reinterpretare il proprio ruolo, allargando gli orizzonti a confronti sempre più ampi.

In termini generali, l'attitudine clinica del medico di laboratorio implica 3 componenti principali:

- la comprensione delle ragioni cliniche (sintomi!) per le quali viene eseguito un esame di campioni biologici;
- la conoscenza del sintomo, come requisito essenziale per l'applicazione di una metodologia appropriata per la definizione delle lesioni associate ai sintomi;
- la consapevolezza dell'implicazione clinica delle diagnosi di laboratorio.

Quest'ultima componente, a sua volta, richiede la capacità di interpretare i risultati dei test di laboratorio affinché la refertazione possa essere clinicamente

contributiva.

Gli stessi concetti di Dipartimento e di Specialità nel processo di clinicizzazione vengono ad essere ridefiniti. Il Dipartimento, inteso in maniera tradizionale come aggregazione di Unità Operative (U.O.), è "superato" da una organizzazione in network interdipartimentali ove interagiscono U.O. e Specialità riguardante una data malattia, mentre la Specialità evolve da una definizione accademica basata sulla malattia, "disease-centered," verso una definizione centrata sul paziente "patient-centered".

E' in questa logica che nel nostro Ospedale sono stati attivati una serie di progetti clinico-laboratoristici, in cui l'integrazione di Divisioni cliniche e Laboratori, e la posizione centrale del paziente sono pienamente realizzate.

Il prototipo di questi progetti è quello riguardante la Fibrosi Cistica (FC).

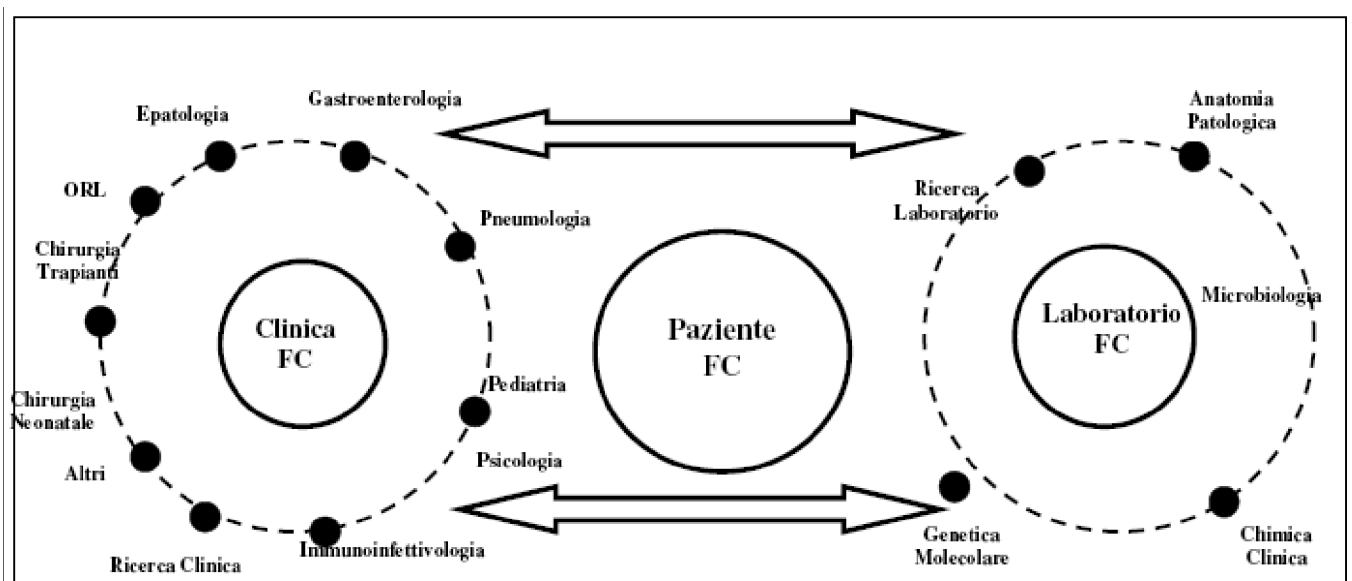
### Il Modello Fibrosi Cistica

Il modello di Laboratorio FC dell'Ospedale Bambino Gesù prevede un team di medici, biologi, infermieri e tecnici, che svolgono attività clinico-ambulatoriale e attività diagnostiche di laboratorio.

Le interazioni e le comunicazioni con le Divisioni cliniche che si occupano della diagnosi e terapia sono regolati da flussi bidirezionali che attraversano il paziente. (Fig.1)

Le attività clinico-ambulatoriali consistono in:

- accoglienza del paziente e dei familiari in un ambiente confortevole, dove questi sono informati e preparati



all'iter diagnostico successivo;

- esecuzione del test del sudore, cui provvede personale medico e infermieristico con provata esperienza;
- consulenza genetica (dopo la diagnosi molecolare)

Aree specialistiche di quattro laboratori del Dipartimento integrano le proprie attività diagnostiche:

- la Genetica molecolare, a cui compete la ricerca delle mutazioni;
- la Microbiologia della Fibrosi Cistica, che provvede all'esame culturale di materiali biologici e allo studio

delle sensibilità di isolati batterici;

- la sezione di Analisi chimico-cliniche, che si occupa specificamente della determinazione degli elettroliti;
- l'Anatomia patologica, con un istopatologo particolarmente dedicato.

Il progetto, oltre che a rappresentare un modello con potenziale applicazione in altri ambiti, si propone di promuovere l'attitudine, la competenza, la ricerca clinica, e, in ultima analisi, il miglioramento continuo della sicurezza e della qualità dell'assistenza.



## Trapianto polmonare per fibrosi cistica in Italia

Serena Quattrucci, Centro Fibrosi Cistica, Policlinico Umberto I, Roma

Il trapianto (Tx) polmonare è a tutt'oggi l'unica terapia efficace per i pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) con insufficienza respiratoria irreversibile. Nei pazienti con FC i primi trapianti, se pur in modo sporadico, sono stati eseguiti all'inizio degli anni '90, ma solo dal 1996 in poi vi è stato un trend in ascesa che ha visto costantemente aumentare il numero di trapianti/anno fino ad un massimo di 30 interventi nel 1999. Dal 2000 il numero degli interventi è diminuito raggiungendo nel 2003 il picco più basso (11 Tx), ma dall'anno successivo si è nuovamente invertita la tendenza fino ad arrivare a 26-28 trapianti/anno negli ultimi due anni (Fig.1).

Anche i Centri di trapianto polmonare con esperienza di FC sono andati aumentando e attualmente se ne contano nove prevalentemente localizzati nel nord Italia (Tab. 1).

Complessivamente in Italia sono stati effettuati dal 1992 fino al 31 dicembre 2006 197 trapianti, compresi 7 re-trapianti per Sindrome della Bronchiolite Obliterante (BOS), su 190 pazienti (96 maschi, 94 femmine).

Nel numero complessivo degli interventi sono compresi 4 trapianti combinati polmoni/fegato o cuore/polmoni/fegato in pazienti con insufficienza respiratoria ed epatica e di questi 3 sono viventi ad una distanza media di 25,6 mesi (range 7-49 mesi) dal trapianto, mentre una paziente è deceduta per infezione polmonare e trombosi dell'arteria epatica.

Sette malati sottoposti a secondo trapianto per BOS sono stati operati dopo un periodo medio di 32,7 mesi dal primo intervento (range 14-60 mesi). Tre di questi sono viventi rispettivamente a 134, 86, 4 mesi dopo il secondo intervento, uno è deceduto per complicanze intraoperatorie, uno per arresto circolatorio nel periodo perioperatorio, uno per aspergilloso invasiva a 52 mesi dal re-trapianto, uno per carcinoma del colon a 62 mesi dal re-trapianto.

L'età media al primo trapianto è di 26,5 anni tuttavia considerando separatamente i due sessi si nota che le femmine giungono al trapianto 18 mesi prima dei maschi.

Suddividendo poi i malati per fasce d'età, si osserva che la maggior parte degli interventi (132 tx) sono stati effettuati in pazienti di età compresa tra 11 e 30 anni (21% tra 11 e 20 anni, 46% tra 21 e 30 anni), il 30% in pazienti di età superiore a 30 anni, mentre solo il 3% (6 pz.) è stato effettuato in bambini di età inferiore a 10 anni (Fig.2).

Per quanto riguarda i pazienti in lista d'attesa, l'elaborazione dei dati del registro fino al 31 dicembre 2004 effettuata dalla prof. Bossi, ha identificato 259 pazienti iscritti in lista tra il 1989 e il dicembre 2004 per trapianto polmonare (bipolmonare in 133 casi pari al 94,6%, combinato con altri organi in 14 casi). Dei

259 pazienti il 54,8% è stato sottoposto a trapianto mentre il 33,6% era deceduto in lista d'attesa e l'11,6% era ancora in attesa di un organo.

Il tempo medio intercorrente tra l'inserimento in lista e il trapianto è stato di 9,6 mesi per le femmine e di 12 mesi per i maschi; per i pazienti deceduti prima del trapianto il tempo medio di permanenza in lista è stato di 5 mesi per le femmine (mediana: 3 mesi) e di 6 mesi per i maschi (mediana: 6 mesi).

Inoltre poiché la mortalità in lista è, nelle femmine, maggiore del 20% circa rispetto ai maschi, è evidente un maggior fabbisogno di organi di piccole dimensioni adatti al sesso femminile ed è auspicabile una revisione dei criteri e dei tempi di inserimento in lista differenziandoli per sesso.

Le complicanze insorgenti a distanza dal trapianto polmonare sono prevalentemente rappresentate dalla BOS e riassunte nella tabella 2. La BOS è stata segnalata in 52 pazienti e il tempo medio di insorgenza dal trapianto è stato di 29,2 mesi (range 2-84 mesi) (Tab.3). La relativamente scarsa incidenza della BOS nella casistica italiana potrebbe essere spiegata con la brevità del follow-up che caratterizza ancora la maggior parte dei trapianti rispetto alle esperienze di durata più lunga soprattutto inglesi e nordamericane.

Considerando poi la curva di sopravvivenza dei pazienti sottoposti al trapianto si può evidenziare che la mediana della sopravvivenza al trapianto è pari a sette anni (Fig.3).

I risultati ottenuti in circa quindici anni hanno dimostrato come il trapianto polmonare sia ormai anche in Italia prassi consolidata e valida opzione terapeutica per i malati in insufficienza respiratoria terminale. Maggiori sforzi devono essere fatti per aumentare il pool dei donatori e per ottimizzare il "timing" per la iscrizione in lista soprattutto per le pazienti di sesso femminile.

E' auspicabile infine la nascita di studi policentrici che mettano a confronto protocolli diversi di immuno - soppressione allo scopo di identificare quali tra i farmaci ora disponibili siano più efficaci nel ridurre il rischio della BOS e meno dotati di effetti collaterali.

Si ringraziano i Centri di Trapianto e i Centri per la cura della FC che con la loro collaborazione hanno permesso questa presentazione.

*I dati forniti sono stati raccolti mediante il lavoro svolto dalla Commissione Trapianti del Gruppo Italiano FC mentre l'aggiornamento 2005-2006 si è basato sui dati provenienti da tutti i Centri Italiani di trapianto e forniti dai colleghi: Colledan, Candusso e Parigi (Bergamo); Cavallo (Torino), Di Sant'Ambrogio (Milano); Oggioni e Meloni (Pavia); Rea e Loi (Padova); Quattrucci (Roma, Policlinico Umberto I); Parisi (Roma, Bambino Gesù); Vitulo e Pardo (Palermo).*

*Le elaborazioni delle curve di sopravvivenza e i dati della lista d'attesa sono dovuti alla cortese collaborazione della Prof. Anna Bossi (Istituto di Biometria e Statistica di Milano).*

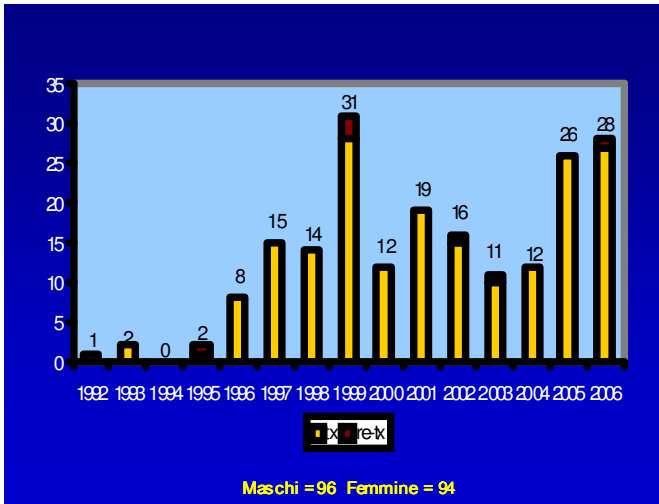


Figura 1. Numero dei trapianti per anno in Italia (197 trapianti).

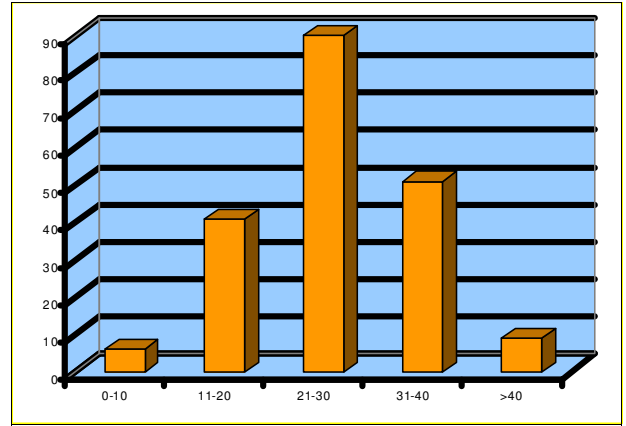


Figura 2. Trapianti suddivisi per fasce di età.

CENTRI DI TRAPIANTO POLMONARE	N°
• ROMA - Policlinico Umberto I	65
• PAVIA	37
• PADOVA	34
• BERGAMO	20
• TORINO	16
• ROMA - Osp. Bambino Gesù	14
• PALERMO	8
• MILANO – Policlinico	2
• SIENA	1
<b>Tot</b>	<b>197 (31 dic 2006)</b>

Tabella 1. Attività dei Centri Trapianto in Italia.

DIABETE	43%
BOS	27,3%
IPERTENSIONE	30,8%
IRC	20%
OSTEOPOROSI	12,3%
INFEZIONE DA ASPERGILLO	11,5%
NEOPLASIE	5,3%
CHIRURGICHE	1,53%
CARDIOLOGICHE	1,5%

Tabella 2. Complicanze a distanza dal trapianto.

- 52/190 pazienti affetti da BOS
- Tempo medio di insorgenza: 29,2 mesi (range 2-84)
- 7 retrapianti
- 23 deceduti:
  - BOS: 19 pz
  - Linfoma: 1 pz
  - Cause imprecisate: 1 pz
  - Suicidio: 1 pz
  - Complicanze intraoperatorie: 1 pz

Tabella 3. Incidenza della sindrome della bronchiolite obliterante (BOS).

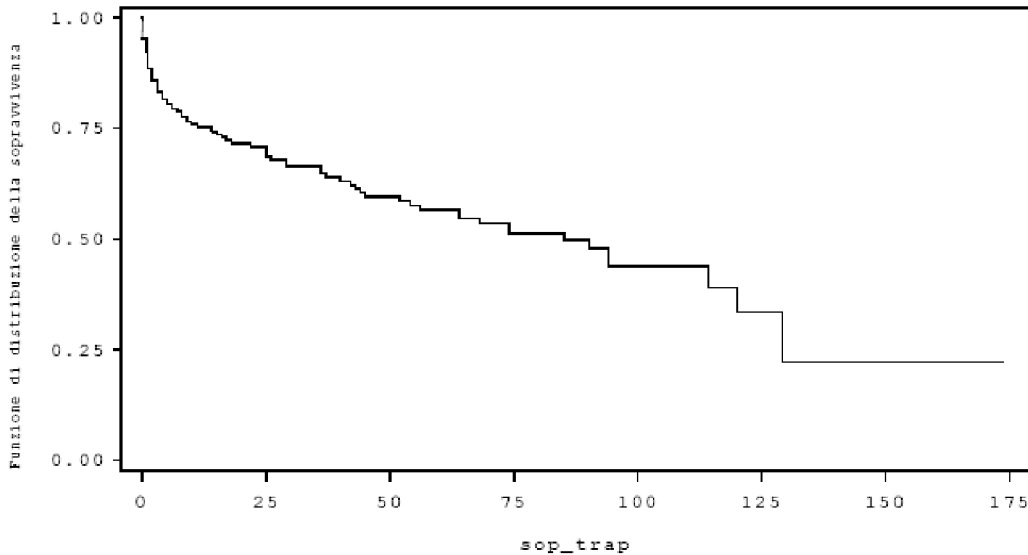


Figura 3. Curva di sopravvivenza dal trapianto bpolmonare in FC.

# TRAPIANTO DI FEGATO IN FIBROSI CISTICA

Francesca Pardo, Centro Fibrosi Cistica, Palermo

Marco Spada, Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad alta specializzazione (ISMETT), Palermo

## Introduzione

La fibrosi cistica (FC) è una malattia congenita, cronica, evolutiva dell'epitelio secretorio causata da una mutazione del gene che codifica la sintesi della proteina chiamata CFTR: "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator". Questa proteina, localizzata nella membrana apicale delle cellule epiteliali, regola gli scambi idroelettrolitici che avvengono attraverso i canali del cloro cAMP-dipendenti. Il gene che codifica questa proteina è stato localizzato nel 1989 sul braccio lungo del cromosoma 7. All'alterazione della proteina consegue un'anomalia del trasporto di sali che determina principalmente una produzione di secrezioni "disidratate". La malattia coinvolge numerosi organi ed apparati: l'apparato respiratorio, dalle prime vie aeree al tessuto polmonare, il pancreas nella produzione di enzimi digestivi, il fegato, l'intestino e l'apparato riproduttivo, soprattutto nei maschi.

La CFTR è localizzata anche a livello delle cellule epiteliali biliari, dove regola la fluidità e l'alcalinità della bile. Il coinvolgimento epatico è presente in più di un quarto dei pazienti affetti da FC, si manifesta precocemente ed ha solitamente decorso lentamente progressivo (1). In alcuni casi, in presenza di alcuni fattori favorevoli che non sono ancora stati del tutto identificati (2), il coinvolgimento epatico determina lo sviluppo di una colangiopatia ostruttiva cronica che evolve in cirrosi biliare secondaria. Analogamente ad altre patologie che coinvolgono primariamente i colangiociti, l'insufficienza epatica si manifesta tardivamente, mentre le principali manifestazioni della malattia sono rappresentate dall'ipertensione portale e dalle sue complicanze. I dati del registro USA della FC documentano che l'insufficienza epatica è la 4<sup>a</sup> causa di morte tra i pazienti affetti da FC (3).

Ad eccezione dell'acido ursodesossicolico, che può rallentare in alcuni casi lo sviluppo della cirrosi secondaria (4), la terapia della malattia epatica è unicamente sintomatica.

## Fibrosi cistica e trapianto di fegato

Il trapianto di fegato rappresenta una concreta possibilità di cura per i pazienti affetti da cirrosi biliare secondaria a FC. Nonostante la fragilità di questi pazienti e il teorico impatto negativo dell'immunosoppressione sul rischio di sviluppo di infezioni polmonari, il trapianto di fegato è stato utilizzato con successo in numerosi centri (5-9). Tuttavia, le casistiche sino ad ora pubblicate sono numericamente esigue e rimangono da chiarire numerosi aspetti relativi all'impiego del trapianto di fegato nei pazienti con FC. Tra questi, il ruolo della

funzionalità respiratoria nel determinare il timing del trapianto ed il suo impatto sulla sopravvivenza post-trapianto. In quest'ottica, i parametri che vengono correntemente utilizzati per stimare la gravità dell'insufficienza epatica e, di conseguenza, l'urgenza del trapianto – la presenza di coagulopatia, l'ipoalbuminemia e l'iperbilirubinemia, l'ascite intrattabile, l'encefalopatia e la sindrome epato – renale, non sono così rilevanti nel paziente affetto da FC nel quale la malnutrizione e l'insufficienza respiratoria sono solitamente le manifestazioni cliniche più rilevanti.

Recentemente il nostro centro ha partecipato ad un indagine condotta presso i centri trapianti che aderiscono allo European Liver Transplant Registry, volto a migliorare le conoscenze sull'impiego del trapianto di fegato nei pazienti affetti da FC. Dal 1997 al 2002 sono stati inseriti nel registro 79 casi di trapianto di fegato effettuato in pazienti con FC. Lo studio è stato condotto inviando uno specifico questionario a 113 centri trapianti e a 421 centri europei per la FC (10). Al termine dello studio sono state raccolte informazioni da 15 centri trapianti (13%) e 62 centri FC (15%). Di questi, 5 centri trapianti e 45 centri FC non avevano esperienza diretta di trapianto, mentre 10 centri trapianti e 17 centri FC hanno fornito informazioni su 60 pazienti sottoposti a trapianto di fegato tra il 1990 ed il 2001. Di questi, 57 sono stati utilizzati nello studio, mentre 3 sono stati esclusi per l'incompletezza dei dati forniti.

Il 74% dei pazienti era di sesso maschile; l'età al momento del trapianto era compresa tra i 2 ed i 27 anni (mediana 12,2 anni). Il genotipo era noto in 37 casi, con la mutazione F508 descrittiva nel 78% dei cromosomi. Nel 98% dei casi i pazienti erano affetti da insufficienza pancreatica e nel 21% da diabete.

Prima del trapianto l'89% dei pazienti aveva varici esofagee e, tra questi, il 42% aveva avuto almeno un episodio di sanguinamento gastrointestinale. L'ascite e l'encefalopatia porto-sistemica era presente rispettivamente nel 44% e nel 13% dei pazienti trapiantati, mentre solo uno di loro aveva una sindrome epato – renale. La gravità dell'insufficienza epatica, determinata mediante lo score di Child –Turcotte – Pugh (10), era documentata nel 37% dei casi ed era di grado lieve - moderato (score A6-B9) nell'86% e di grado severo nel restante 14%.

Nella maggior parte dei casi la decisione di procedere al trapianto si è basata su diversi fattori. L'indicazione al trapianto è stata l'insufficienza epatica nel 69% dei casi, l'ipersplenismo nel 57%, la malnutrizione del 45%, il sanguinamento da varici esofagee nel 27%, il peggioramento della funzione respiratoria nel 16%,



l'ascite nel 14%, l'isolamento nelle vie aeree di germi multi – resistenti nel 4% e l'encefalopatia porto – sistemica nel 2%.

Per quanto concerne la funzionalità respiratoria, valutata mediante la misurazione del FEV<sub>1</sub>, questa era pressoché normale nel 22% dei pazienti (FEV<sub>1</sub> > 80%), moderatamente compromessa (FEV<sub>1</sub> tra 40% e 80%) nel 67% e gravemente compromessa (FEV<sub>1</sub> < 40%) nell'11%.

I pazienti sono stati trapiantati prevalentemente con tecnica di trapianto di fegato intero da donatore cadavere (79%), tuttavia sono state utilizzate con successo anche le tecniche di trapianto di fegato parziale: fegato ridotto (10%), split liver (7%) e trapianto da donatore vivente (4%). Due pazienti sono stati sottoposti a trapianto combinato di polmoni, cuore e fegato.

Il follow up mediano post-trapianto è stato di 3,7 anni (range 0-11 anni). Quattro pazienti sono stati ritrapiantati e due sono successivamente deceduti. In totale i pazienti deceduti dopo il trapianto sono stati 9 e le cause di morte sono descritte in tabella 1. La sopravvivenza dei pazienti a 6 anni, determinata con il metodo di Kalan-Meier, è quindi risultata essere dell'81%, mentre quella del fegato trapiantato del 79%. Le principali complicanze postoperatorie sono descritte in tabella 2.

La mortalità è risultata essere significativamente maggiore nei pazienti con funzionalità respiratoria molto compromessa, mentre non si sono registrate differenze di sopravvivenza in relazione alla gravità dello scompenso epatico. Nei pazienti con sopravvivenza post-trapianto superiore a 6 mesi si è costantemente registrato un significativo miglioramento della funzionalità respiratoria, con un incremento medio della FEV<sub>1</sub> pari al 6%.

I risultati dello studio dimostrano in modo chiaro che il trapianto di fegato è un'ottima opzione terapeutica per quei pazienti con FC ad interessamento epatico: l'outcome dopo il trapianto è buono e la funzionalità respiratoria migliora. Inoltre, lo studio conferma che la malattia epatica è caratteristica dei pazienti a fenotipo grave e si manifesta precocemente, di solito nella 1<sup>a</sup> decade di vita.

Dalle informazioni ottenute sulle indicazioni al trapianto, sembrerebbe possibile concludere, ad una prima analisi, che in diversi casi il trapianto avrebbe potuto essere dilazionato nel tempo. I pazienti con ipersplenismo e funzione epatica quasi nella norma manifestano generalmente una progressione molto lenta della malattia epatica; analogamente i sanguinamenti da varici esofagee possono essere controllati e prevenuti con un'adeguata terapia medica ed endoscopica.

Il giusto timing del trapianto nel paziente con FC è argomento di attuale dibattito. Alcuni autori (6,11) suggeriscono che il trapianto debba essere effettuato solo nei pazienti con segni di insufficienza epatica terminale (coagulopatia, iperbilirubinemia,

encefalopatia). Altri (12), ritengono che il trapianto vada preso in considerazione più precocemente poiché l'insufficienza epatica aumenta significativamente il rischio di mortalità da complicanze polmonari (13). La casistica del nostro studio dimostra una tendenza ad effettuare il trapianto quando la malattia epatica non ha ancora raggiunto uno stadio avanzato, e questo può in parte spiegare i buoni risultati ottenuti.

La FC è una malattia a carattere progressivo e ciò rende difficile la scelta del timing più appropriato per il trapianto, anche se sono stati descritti casi di trapianto combinato di fegato e polmoni (14,15). Una risposta definitiva in questo ambito può venire solo da studi di carattere prospettico che considerino i pazienti affetti da FC con grave coinvolgimento epatico e che analizzino il loro outcome dopo trapianto o in assenza di trapianto. Al riguardo è indispensabile sviluppare e validare uno score che permetta di stimare la probabilità di sopravvivenza dei pazienti con malattia epatica da fibrosi cistica (5,15).

Non inaspettatamente, il diabete è una complicanza piuttosto frequente dopo trapianto di fegato dal momento che il 10-20% dei giovani pazienti con FC soffrono di questa condizione (16). Inoltre, un'augmentata incidenza di diabete è stata descritta nei casi di FC con insufficienza epatica terminale (17) e di trapianto di polmone per FC (18). Analogamente, l'osteoporosi è una complicanza della FC e può essere aggravata dall'insufficienza epatica (17,19).

L'incidenza delle complicanze infettive non è più elevata che in pazienti sottoposti a trapianto di fegato per altre indicazioni e ciò a dispetto del fatto che i malati di FC sono generalmente colonizzati da patogeni quali *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*; comunque, in questa categoria di pazienti il rischio infettivo non va sottostimato (20).

I migliori risultati osservati nei pazienti con buona funzionalità respiratoria sottolineano come la malattia polmonare rappresenti un importante fattore prognostico per questi soggetti nei quali, generalmente, si assiste ad un progressivo scadimento della funzionalità respiratoria che se documentato dovrebbe indurre ad anticipare l'inserimento nella lista di attesa per il trapianto di fegato, pena la necessità di ricorrere ad un trapianto combinato. Nonostante siano stati riportati buoni risultati dopo trapianto combinato di fegato e polmoni o di fegato, cuore e polmoni (14,15), la disponibilità di donatori multiorgano di dimensioni adeguate è significativamente limitata e ciò comporta lunghi tempi di attesa ed un'augmentato rischio di mortalità prima del trapianto.

E' disponibile sempre una crescente evidenza scientifica che il trapianto di fegato possa migliorare la performance respiratoria nei pazienti FC (5-9) e ciò è ulteriormente suffragato dai risultati del nostro studio, anche se i meccanismi fisiopatologici che stanno alla base di questo fenomeno non sono ancora stati chiariti; tra i meccanismi che sono stati sinora chiamati in causa

troviamo il miglioramento dello stato nutrizionale, la risoluzione dell'ascite, il miglioramento della funzionalità diaframmatica e l'effetto dell'immunosoppressione (5,21).

Presso l'Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad alta specializzazione (ISMETT) sono stati effettuati 4 trapianti di fegato in pazienti affetti da FC. Tre dei 4 pazienti operati hanno ricevuto il trapianto di un fegato parziale ottenuto con tecnica di split liver o con tecnica di trapianto da donatore vivente. I dati clinici relativi a questi pazienti sono riportati in tabella 3.

### Conclusioni

In conclusione, il trapianto di fegato è senza dubbio un'opzione terapeutica nei pazienti affetti da FC con malattia epatica avanzata. Sino a quando non saranno disponibili fattori prognostici più specifici che consentano di valutare la gravità della compromissione epatica (22), il trapianto è indicato in quei pazienti nei quali la funzionalità respiratoria non è ancora gravemente compromessa ( $FEV_1 > 50\%$ ), tenendo in considerazione che il trapianto è spesso in grado di migliorare la situazione polmonare. Chiaramente, sono necessarie maggiori informazioni sull'esito a lungo termine del trapianto, in relazione del fatto che la sopravvivenza a lungo termine è con ogni probabilità significativamente influenzata dalla progressione della malattia polmonare.

### Bibliografia

- Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A, et al. Liver disease in cystic fibrosis: a prospective study on incidence, risk factors, and outcome. *Hepatology* 2002; 36: 1374.
- Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet* 2002; 111: 88.
- Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2000 Annual Report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation, 2001.
- Colombo C, Battezzati PM, Podda M, Bettinardi N, Giunta A and the Italian Group for the Study of the Ursodeoxycholic acid in Cystic Fibrosis. Ursodeoxycholic acid for liver disease associated with cystic fibrosis: a doubleblind multicenter trial. *Hepatology* 1996; 23: 1484.
- Noble-Jamieson G, Barnes ND, Jamieson N, Friend P, Calne R. Liver transplantation for hepatic cirrhosis in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 1996; 89s: 31.
- Mack DR, Traystman MD, Colombo JL, et al. Clinical denouement and mutation analysis of patients with cystic fibrosis undergoing liver transplantation for biliary cirrhosis. *J Pediatr* 1995; 127: 881.
- Mieles LA, Orenstein D, Taperman L, Podesta L, Koneru B, Starzl BE. Liver transplantation in cystic fibrosis. *Lancet* 1989; 1: 1073.
- Chavez-Cataya R, Drage M, Jamieson NV, et al. Biliary complications in liver transplantation for cystic fibrosis. *Transplant Proc* 1999; 31: 2411.
- Urgelles FE, Bario GAMI, Martinez CMC, et al. Pulmonary function after liver transplantation in cystic fibrosis. Report of 4 cases. *An Esp Pediatr* 2001; 54: 228.
- Melzi ML, Kelly DA, Colombo C, Jara P, Manzanares J, Colledan M, Strazzabosco M, DeLorenzo P, Valsecchi MG,

Adam R, Gridelli B, Assael BM; EGSLTCF; European Liver Transplant Association (ELTA); European Cystic Fibrosis Society (ECFS). Liver transplant in cystic fibrosis: a poll among European centers. A study from the European Liver Transplant Registry. *Transpl Int*. 2006;19: 726-31.

- Sharp HL. Cystic fibrosis liver disease and transplantation. *J Pediatr* 1995; 127: 944.
- Noble-Jamieson G, Barnes ND. Liver transplantation for cirrhosis in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1996; 128: 314.
- Feigelson J, Anagnostopoulos C, Poquet M, et al. Liver cirrhosis in cystic fibrosis: therapeutic implications and longterm follow-up. *Arch Dis Child* 1993; 68: 653.
- Couetil JP, Soubrane O, Houssin DP, et al. Combined heart-lung-liver, double lung-liver, and isolated liver transplantation for cystic fibrosis in children. *Transpl Int* 1997; 10: 33.
- Milkiewicz P, Skiba G, Kelly D, et al. Transplantation for cystic fibrosis: outcome following early liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 208.
- Mackie AD, Thornton SJ, Edenborough FP. Cystic fibrosis-related diabetes. *Diabet Med* 2003; 20: 425.
- Colombo C, Costantini D, Rocchi A, et al. Effects of liver transplantation on the nutritional status of patients with cystic fibrosis. *Transpl Int* 2005; 18: 246.
- Dosanjh A. A review of nutritional problems and the cystic fibrosis lung transplant patient. *Pediatr Transplant* 2002; 6: 388.
- Ninkovic M, Love SA, Tom B, Alexander GJ, Compston JE. High prevalence of osteoporosis in patients with chronic liver disease prior to liver transplantation. *Calcif Tissue Int* 2001; 69: 321.
- Ghobrial RM, Farmer DG, Amersi F, Busuttill RW. Advances in pediatric liver and intestinal transplantation. *Am J Surg* 2000; 180: 328.
- Rosenstein BJ, Eigen H. Risk of alternative-day prednisone in patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* 1991; 87: 245.
- Narkewicz MR. Markers of cystic fibrosis-associated liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 421.

Causa di morte	No. pazienti
Rigetto cronico	2
Insufficienza respiratoria	3
Insufficienza epatica	1
Sepsi	2
Insufficienza multiorgano	2
Emorragia cerebrale	2
Trombosi dell'arteria epatica	1
Aspergillosi sistemica	1

Tabella 1 – Cause di morte nei pazienti con fibrosi cistica sottoposti a trapianto di fegato

Complicanza	% pazienti
Diabete	55
Rigetto acuto	19
Infezione extrapolmonare	18
Insufficienza renale	16
Poliposi nasale	14
Ipertensione	14
Complicanza biliare	14
Complicanza vascolare epatica	10
Rigetto cronico	5
Malattia linfoproliferativa	3
Osteoporosi	3
Altro	32

Tabella 2 – Complicanze postoperatorie nei pazienti con fibrosi cistica sottoposti a trapianto di fegato

n	Dati al momento del trapianto								Follow up	
	Età (anni)	Peso (kg)	GB (el/10 <sup>3</sup> µl)	PLT (el/10 <sup>3</sup> µl)	Albumina (g/dl)	Varici esofagee	FEV <sub>1</sub> (%)	Tipo di trapianto	Status	Funzionalità epatica
1	9	18	8.2	142	3.8	SI	72	SLT	Vivente a 52 mesi	Normale
2	10	30	5.4	85	2.4	NO	78	FI	Vivente a 15 mesi	Normale
3	18	53	2.2	32	4.0	SI	68	LD-DV	Ritrapiantato; vivente a 30 mesi*	Normale
4	21	40	3.9	83	4.3	SI <sup>#</sup>	70	LD-DV	Vivente a 30 mesi	Normale

GB: globuli bianchi; PLT: piastrine; FEV<sub>1</sub>: volume di frazione espirata a 1 secondo; SLT: segmento epatico laterale sinistro da split; FI: fegato intero; LD-DV: lobo epatico destro da donatore vivente.

\* Paziente ritrapiantato in 10<sup>a</sup> giornata postoperatoria per trombosi dell'arteria epatica con lobo destro allargato da split.

<sup>#</sup> Sanguinamento da varici esofagee.

Tabella 3 – Trapianti di fegato in pazienti affetti da fibrosi cistica effettuati presso l'ISMETT



# Orizzonti FC

Organo della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica

Cystic Fibrosis and Microbiology - Silvia Campana	2
The cooperation of clinicians and microbiologists - Flavio Favari	4
Staphylococcus aureus and Cystic Fibrosis - Graziana Manno	5
Pseudomonas aeruginosa - Silvia Campana	8
Immunologic monitoring of PA infection - Novella Ravenni	13
Burkholderia cepacia complex and other difficult Gram negative bacteria - Priscilla Cocchi	19
Fungi in CF lung infection - Graziana Manno	25
Mycobacteria in CF - Flavio Favari	28
Identification methods for Rapid Growth Mycobacteria - Lisa Cariani	29
Organizational model for a CF Laboratory - Ersilia Fiscarelli and Francesco Callea	38
Lung Transplant for CF in Italy - Serena Quattrucci	40
Liver Transplant for CF in Italy - Francesca Pardo and Marco Spada	42

Published by the Editorial Committee of the Italian CF Society

**Editor-in-Chief**

Donatello Salvatore

**Editorial Board**

Michele D'Andria

Filippo Festini

Bianca Grosso

Maria Lucia Furnari

Giovanna Pizzamiglio

Sergio Zuffo

**Graphic project and editing**

Filippo Festini

**The Italian Cystic Fibrosis Society**

President: Carla Colombo

Board Members: Silvana Ballarin, Valeria Casavola, Angelo Cosimi, Vincenzina Lucidi, Giuseppe Magazzù, Teresa Repetto, Sergio Zuffo.

email: [sifc@sifc.it](mailto:sifc@sifc.it), [segreteria@sifc.it](mailto:segreteria@sifc.it)

Postal account n. 63 40 64 25 in the name of SIFC, via L. Temolo 4, Milano

Administrative headquarters: Via L. Temolo 4 - 20126 Milano

Tel. 02/45498282 (int. 303) Fax 02/45498199

CF 97367700586

[www.sifc.it](http://www.sifc.it)



**Volume 3, Issue 2 - December 2, 2007**