

TITOLO: Miglioramento delle capacità di diagnosi molecolare di infezioni invasive da pneumococco, meningococco e Haemophilus influenzae nell'ottica di un miglioramento delle strategie di prevenzione e terapia

ANALISI STRUTTURATA DEL PROBLEMA

Problema

Lo *Streptococcus pneumoniae* (pneumococco), la *Neisseria meningitidis* (meningococco) e l'*Haemophilus influenzae* (Hi) sono tra le principali cause di mortalità e morbilità in tutto il mondo. Lo pneumococco causa infezioni invasive che si manifestano come sepsi, meningite, polmonite lobare, osteomielite od altre gravi infezioni. Il meningococco e l'*Haemophilus* sono responsabili soprattutto di forme invasive quali meningiti e sepsi. Per questi patogeni l'incidenza massima si riscontra in età pediatrica e, per le forme di meningite e sepsi, è particolarmente elevata nei bambini di età inferiore a 5 anni. Per quanto riguarda lo pneumococco fino ad oggi sono stati riconosciuti oltre 90 sierotipi (1) in tutto il mondo ma è necessario monitorizzare il coinvolgimento dei vari sierotipi nelle forme invasive. Anche di meningococco ed Hi esistono numerosi sierotipi, ma quelli più frequentemente associati a patologie invasive sono per il meningococco i ceppi A, B, C, Y, W, 135 e, per Hi, i tipi b e c. La vaccinazione anti-Hi è inclusa all'interno del vaccino esavalente offerto da tutte le regioni nel primo anno di vita. Nel Piano Nazionale Vaccini 2005 le vaccinazioni anti-pneumococcica ed anti-meningococcica sono state inserite tra quelle consigliabili, per le quali è necessario però un progetto regionale specifico. In particolare, il recente Piano nazionale Vaccini elaborato nel 2005 dal Ministero della Salute, riportando quelli che sono gli obiettivi dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, sottolinea l'importanza delle "...rilevazioni epidemiologiche delle malattie infettive..." (2) e la necessità di valutare "...l'impatto delle malattie infettive prevenibili con vaccino sui servizi di diagnosi e cura e sulle esperienze di mortalità della popolazione..." (2). Al momento esiste un sistema di sorveglianza nazionale che valuta però solo meningiti e sepsi e non altre forme invasive. Con il sistema attuale il patogeno in causa rimane in numerosi casi non identificato (3). Inoltre non tutti gli ospedali sono adeguatamente sensibilizzati alla ricerca di pneumococco, meningococco ed Hi in patologie invasive diverse da meningite e sepsi (ad es. osteomieliti, artriti settiche, polmoniti, batteriemie ecc.) e non tutte le regioni hanno a disposizione laboratori in grado di effettuare la diagnosi con metodologie sufficientemente sensibili. I problemi essenziali sono dunque:

La presenza di numerosi falsi negativi nei test fino ad oggi utilizzati per la diagnostica in vitro dei patogeni in causa

Necessità di indagini di laboratorio con una maggior sensibilità e specificità di quelle attualmente in uso per la diagnosi di germe e per la sua tipizzazione

Scarsa sensibilizzazione dei clinici alla ricerca dei patogeni come pneumococco, meningococco ed Hi nel corso di patologie invasive non riferite a questi patogeni

Effettuare un monitoraggio più accurato delle forme invasive da pneumococco, meningococco ed Hi

Monitorare i cambiamenti epidemiologici di tali infezioni in conseguenza degli interventi di profilassi e terapia adottati

Spiegazioni plausibili

Per quanto riguarda l'identificazione del patogeno, l'utilizzo per la ricerca batterica di metodi colturali si è dimostrato, negli anni passati e recenti, insoddisfacente, in quanto la terapia antibiotica effettuata nei pazienti prima del ricovero ospedaliero impedisce in molti casi lo sviluppo delle colture batteriche e la conseguente tipizzazione. Inoltre problemi tecnici legati al prelievo, alla conservazione ed al trasporto del campione riducono la vitalità del germe determinando numerosi falsi negativi nell'identificazione dei patogeni con metodi colturali. La conseguenza è che allo stato attuale la panoramica delle infezioni è parziale e non consente un monitoraggio dei ceppi in causa nelle forme invasive.

Per quanto riguarda la tipizzazione, i metodi di tipizzazione utilizzati fino ad oggi in tutto il mondo vengono effettuati prevalentemente su colture, pertanto manca la possibilità di tipizzazione in tutti i casi in cui la crescita del germe è assente.

Per quanto riguarda la sensibilizzazione dei clinici, questa è necessaria, sia per le forme invasive

più comuni che per quelle più inusuali nelle quali il medico non considera tra i possibili patogeni in diagnosi differenziale pneumococco, meningococco e Hi.

Soluzioni proposte

Per la soluzione dei problemi su esposti si propongono pertanto le seguenti soluzioni:

Mettere a punto una metodica di indagine in biologia molecolare che consenta di identificare il germe su campioni biologici anche in assenza di vitalità del germe (4)

Paragonare la sensibilità della diagnostica molecolare rispetto alla diagnostica colturale sia nell'individuazione del germe che nella sua tipizzazione

Diffondere la capacità diagnostica molecolare in tutte le regioni d'Italia in modo da agevolare l'esecuzione del test nelle periferie e migliorare ulteriormente i risultati di sorveglianza epidemiologica

Incrementare la sensibilizzazione dei clinici verso le forme invasive da pneumococco, meningococco ed Hi mediante incontri locali con referenti regionali clinici e laboratoristici che possano, a cascata, diffondere la conoscenza e la sensibilizzazione nella propria regione.

Creare una rete per la raccolta di campioni biologici e dati clinici ad essi correlati allo scopo di identificare i ceppi di pneumococco, meningococco e Hi più frequentemente in causa nelle forme invasive del bambino e dell'adulto

I campioni biologici (sangue, liquor, liquido pleurico) raccolti presso i vari ospedali verranno inviati contemporaneamente e separatamente al locale laboratorio di microbiologia per esami colturali e al Laboratorio di Immunologia dell'Ospedale A.Meyer per esami in biologia molecolare (vedi allegato 2 per le istruzioni di raccolta e spedizione).

Utilizzando le metodiche molecolari implementare il monitoraggio della prevalenza dei vari ceppi in modo da chiarire se la vaccinazione di massa con i vaccini disponibili, eliminando i ceppi attualmente più frequenti, lascia libera la "scena epidemiologica" ad altri ceppi di pneumococco, meningococco e Hi che potrebbero diventare nel futuro i ceppi prevalenti e clinicamente più importanti

Fattibilità

Il progetto si è dimostrato fattibile già in uno studio pilota condotto nella Regione Toscana dove la collaborazione continua tra clinici e laboratoristi e l'utilizzo di un metodo in biologia molecolare direttamente su campioni biologici e non su colture ha consentito di ottenere risultati preliminari soddisfacenti (vedi allegato 3).

Criticità

Il primo punto critico del progetto è la sensibilizzazione dei clinici. Infatti, in assenza di essa lo studio sulle forme invasive e la sorveglianza epidemiologica risulterebbe parziale ed incompleta.

Il secondo punto critico del progetto è l'identificazione, da parte delle singole regioni, del referente clinico regionale e dei centri regionali di laboratorio che possano effettuare la diagnostica molecolare. Si tratta in quest'ultimo caso di raggiungere centri che possiedano dei requisiti minimi in termini di conoscenza di biologia molecolare ed in termini di apparecchiature disponibili.

Bibliografia

1. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2759-62
2. Ministero della Salute. Piano Nazionale Vaccini 2005, p. 101
3. Dati SIMI, Istituto Superiore di Sanità, anno 2005, <http://www.simi.iss.it/dati.htm>
4. Morrison KE, Lake D, Crook J: Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis *J Clin Microbiol* 2000; 38:434-7

Allegato 2

OBIETTIVO GENERALE Migliorare la capacità di diagnosi delle infezioni invasive da pneumococco, meningococco e Hi con particolare riguardo all'età pediatrica utilizzando nuovi metodi di biologia molecolare.

Ridisegnare gli aspetti epidemiologici delle infezioni invasive determinate dai patogeni sopra elencati in modo da modulare un intervento di prevenzione e terapia più adeguato

OBIETTIVO SPECIFICO 1. Ridurre il numero dei casi non diagnosticati (vedi problema 1 e 2) nella diagnosi di infezioni invasive da pneumococco, meningococco e Hi utilizzando una metodica più sensibile (Realtime PCR e Multiplex PCR sequenziale) di quelle attualmente in uso. Per la messa a punto della metodica nei primi 6 mesi si utilizzeranno campioni provenienti dall'Ospedale A.Meyer.

OBIETTIVO SPECIFICO 2. diffondere la conoscenza dei suddetti metodi di biologia molecolare nelle varie regioni mediante insegnamento delle tecniche ai centri di riferimento regionale indicati dalle regioni. Questo si realizzerà nel I anno mediante incontri tra il personale competente del Laboratorio di Immunologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer di Firenze e il personale laboratoristico individuato dalle varie regioni (vedi problema 1 e 2); nel II anno il personale specializzato del Laboratorio di Immunologia effettuerà

a. sostegno tecnico per i centri di riferimento regionale che presentino difficoltà nell'esecuzione autonoma dei test

b. conservazione di tutti i campioni biologici e test su quelli risultati dubbi nei laboratori di riferimento regionale

c. controllo di qualità random sui test eseguiti dai laboratori di riferimento regionale

OBIETTIVO SPECIFICO 3. migliorare la conoscenza delle malattie invasive da pneumococco, meningococco e Hi presso i clinici di ospedali pediatrici e di alcuni ospedali dell'adulto scelti a campione (vedi problema 3)

OBIETTIVO SPECIFICO 4. Organizzare una rete che preveda la raccolta dei campioni biologici e l'esecuzione dei test in biologia molecolare presso il Laboratorio di Immunologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria A.Meyer di Firenze nel corso del primo anno. Per l'anno successivo la rete dovrà prevedere anche l'invio dei campioni biologici, oltre che Laboratorio di Immunologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria A.Meyer di Firenze, anche ai centri identificati dalle regioni e che abbiano effettuato i corsi previsti all'obiettivo 2 e 3.

OBIETTIVO SPECIFICO 5. Raccogliere le schede cliniche dei pazienti pervenute congiuntamente ai campioni biologici (vedi problema 4).

OBIETTIVO SPECIFICO 6. Raccogliere ed elaborare i dati per monitorare eventuali cambiamenti epidemiologici (vedi problema 5)

PIANO DI VALUTAZIONE PER OGNI OBIETTIVO SPECIFICO

Azione	Indicatore di processo	Standard di processo
Mettere a punto, descrivere e validare una metodica per diagnosi di pneumococco, meningococco e Hi mediante Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	Numero di campioni pervenuti	Non applicabile
Mettere a punto, descrivere e validare una metodica per sierotipizzazione di pneumococco e meningococco mediante multiplex PCR sequenziale	Numero di campioni pervenuti	Non applicabile
Diffondere la conoscenza delle metodiche di laboratorio per la diagnosi e sierotipizzazione di patogeno (Realtime PCR e PCR sequenziale multiplex)	Numero di incontri con referenti regionali di laboratorio presso il Laboratorio di Immunologia	Almeno 3 incontri (uno per nord-Italia, uno per centro-Italia, uno per Sud-Italia)
Sensibilizzazione dei clinici	Numero di incontri con i referenti regionali ed altri medici ospedalieri	Almeno 6 incontri (due per nord-Italia, due per centro-Italia, due per Sud-Italia)
I anno: Spedizione e raccolta presso il Laboratorio di Immunologia di Firenze di campioni biologici provenienti dalle varie regioni	Numero di esami refertati entro 15 gg	>80%
	Numero di campioni pervenuti	
II anno: Spedizione e raccolta presso il Laboratorio di Immunologia di Firenze di campioni biologici risultati dubbi presso i laboratori di riferimento regionale; controllo di qualità su campioni random provenienti dai laboratori di riferimento regionale	Numero di esami refertati entro 15 g	>80%
	Numero di campioni dubbi pervenuti	
Invio dei risultati ottenuti all'ISS	Numero di referti inviati	> 90%
	Numero di referti ottenuti	

CRONOGRAMMA

Azioni	I Trimestre	II trimestre	III trimestre	IV trimestre	V trimestre	VI trimestre	VII trimestre	VIII trimestre
1 validazione metodo								
2 diffusione competenze di laboratorio								
3 sensibilizzazione dei clinici								
4 Test di laboratorio e refertazione								
5 Invio dati clinici e risultati a ISS								
6 Raccolta, elaborazione e pubblicazione dei dati								

UNITA' OPERATIVE

Azienda Ospedaliero-Universitaria Anna Meyer (Firenze):

- Laboratorio di Immunologia (UO di Clinica Pediatrica II) Direttore Prof. Chiara Azzari
- UO di Pediatria Medica – Direttore Dr. Massimo Resti
- UO di Clinica Pediatrica 1 – Direttore Prof. Maurizio de Martino

BUDGET

	I anno	II anno	Complessivi
Personale necessario			
1 ricercatore adibito all'attività di laboratorio	40.000	40.000	80.000
1 operatore per rapporti con gli ospedali e i centri di riferimento regionali	20.000	20.000	40.000
Missioni			
Incontri con le regioni	3.000	3.000	6.000
Beni e servizi			
Spese per convenzioni e rapporti con regioni*	30.000	20.000	50.000
Spese per spedizione campioni a carico del destinatario (TNT traco 10)	11.000	10.000	21.000
Reagenti ed altro materiale di consumo	45.000	30.000	75.000
Totale			272.000

Spese generali 10%		27.200
Totale generale		299.200

*comprende gli incontri di formazione con il personale clinico e laboratoristico individuato dalle regioni, i corsi di formazione presso il laboratorio fiorentino e gli interventi di assistenza presso le singole sedi di riferimento regionale