Razionale e linee guida della medicina molecolare in microbiologia clinica

A. Camporese

S.O. di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli, Pordenone

Prospettive della medicina molecolare tra efficienza, efficacia e utilità clinica

Una delle esigenze per migliorare l'impatto clinico del referto microbiologico consiste nel produrre risultati in tempi sempre più rapidi: è infatti ormai riconosciuto che se si vuole incidere in maniera consistente nella scelta terapeutica delle malattie da infezione riducendo al tempo stesso la spesa e, se possibile, il livello di mortalità, è assolutamente prioritario riuscire a fornire una risposta microbiologica in tempi il più possibile ridotti (1-2).

L'evoluzione più recente del *management* microbiologico delle patologie infettive si muove dunque verso la ricerca di una sempre maggiore rapidità diagnostica unitamente allo sfruttamento di sempre più accurate tecniche per l'identificazione degli agenti causali di malattia e di sempre più precise analisi della sensibilità ai farmaci antimicrobici.

Rispetto al passato e ai metodi tradizionalmente a disposizione del microbiologo, le nuove tecnologie, l'automazione e l'informatica stanno effettivamente trasformando progressivamente il modo di gestire tutta la diagnostica microbiologica, consentendo di ridurre il *Turn Around Time* (TAT) in modo significativo: oggi è già possibile, ad esempio, fornire al clinico per mezzo dell'automazione una diagnosi e un'indicazione relativa alla sensibilità degli isolati in termini spesso di pochissime ore. L'avvento delle nuove indagini molecolari non fa che ulteriormente migliorare l'impatto sul TAT, mentre nel contempo si va modificando progressivamente il concetto stesso di diagnosi microbiologica, non più appannaggio solo della microscopia, dell'esame colturale e della rilevazione di antigeni e anticorpi specifici, ma volto in prospettiva all'identificazione della struttura più "intima" dei microrganismi attraverso specifici *targets* genomici.

Non c'è dubbio dunque che in questo panorama di miglioramento generale delle potenzialità diagnostiche e dei tempi di risposta la medicina molecolare, se per certi aspetti già consente di ottenere con elevata sensibilità e specificità e in tempi ridotti l'identificazione di microrganismi che crescono difficilmente o lentamente in coltura, nel prossimo futuro, attraverso un progressivo processo di semplificazione delle metodiche, l'automazione dei processi e la standardizzazione dei test, consentirà di modificare una parte consistente dell'attuale diagnostica microbiologica, soprattutto nel momento in cui saranno maggiormente sviluppati metodi che permettano di identificare più di un microrganismo contemporaneamente (3).

La possibilità di sfruttare più ampiamente indagini che prevedono due o più set di *primers* specifici per diversi microrganismi nel medesimo campione consente infatti di *bypassare* uno degli attuali limiti della medicina molecolare, costituito dall'utilizzo prevalente di tecniche *one- step*.

Lo sviluppo di un sempre maggior numero di metodiche con questi presupposti analitici consentirà di rilevare contemporaneamente più sequenze specifiche di acidi nucleici in diversi materiali biologici, ampliando così lo spettro diagnostico e riducendo i tempi di risposta. Così facendo, l'accresciuta possibilità di fornire una diagnosi microbiologica negli stadi precoci di infezione non farà che implementare ulteriormente l'importanza della medicina molecolare laddove altre diagnostiche sono impotenti, come già avviene ad esempio nel caso delle patologie infettive del SNC o nel caso delle polmoniti atipiche.

Certamente è improbabile comunque che i metodi molecolari possano nell'immediato futuro sostituire *in toto* i metodi tradizionali, vuoi l'isolamento in coltura, comunque spesso necessario per la caratterizzazione genotipica e fenotipica degli isolati a fini tassonomici e clinici, sia i test che misurano i meccanismi di resistenza fenotipica dei microrganismi e consentono lo studio dell'attività dei farmaci antimicrobici. E' noto, infatti, che per il momento le tecniche molecolari non sono in grado di sostituire completamente le attuali indagini previste per la rilevazione *in vitro* delle resistenze microbiche né possono evidenziare nuovi e sconosciuti meccanismi di resistenza, così come è ben noto che la pre-

senza di un gene di resistenza in un microrganismo non significa sempre che esso venga espresso fenotipicamente, mentre l'assenza di un *target* genetico di refrattarietà a sua volta non esclude a priori la possibilità che venga espresso nel tempo un nuovo, imprevedibile meccanismo (3-5).
Viceversa però, come si vedrà, le metodiche molecolari offrono in prospettiva un insostituibile modello per il *fingerprint* degli isolati nel monitoraggio epidemiologico e nella gestione degli *outbreaks*.
Da queste premesse si evince che per molto tempo ancora il microbiologo si troverà a convivere con tecniche tradizionali e molecolari insieme, mentre progressivamente si renderà necessario procedere alla scelta ragionata tra vecchie e nuove filosofie analitiche, rivedendone di volta in volta tutti gli aspetti positivi rispetto agli elementi critici, in una visione clinica e interpretativa della patologia.
Il microbiologo, insomma, se da un lato può oggi contare su nuove e più fruibili possibilità per identificare gli agenti patogeni, dovrà sempre più consapevolmente "pesare" con attenzione il potere diagnostico e dunque la reale utilità clinica e l'efficacia (Tabella I) delle nuove tecniche analitiche, non abbandonando prematuramente collaudati metodi a vantaggio di altri di più recente introduzione.
In tempi di particolare interesse per il *managed care* assume una crescente rilevanza, dunque, una valutazione approfondita della medicina molecolare in termini clinici, organizzativi ed economici, ovvero in termini di efficacia ed efficienza (Tabella I) e di reale costo-beneficio rispetto alla diagnostica tradizionale: nonostante, infatti, sia stato sottolineato e dimostrato da autorevoli autori (2) l'incidenza di un referto analitico prodotto in tempi più rapidi su costi, morbilità e mortalità, pur tuttavia è compito del microbiologo dimostrare con i fatti che un aumento dei costi gestionali del laboratorio, dovuto all'implementazione dei nuovi metodi molecolari e a una diversa organizzazione gestionale che ad essa consegue, sono in grado realmente di incidere profondamente non solo sulla qualità analitica *tout court*, ma sulla qualità totale dell'impatto clinico del referto microbiologico nell'evoluzione della storia naturale della malattia.
Ciò che deve essere valutata è, dunque, la valenza clinica (Tabella II) della medicina molecolare, cioè dove essa può davvero fare la differenza rispetto alle tecniche colturali/biochimiche tradizionali in termini di sensibilità, di specificità e dunque di "efficacia" clinica del risultato e miglioramento del TAT e dove invece sia più razionale continuare ad eseguire "vecchi" metodi, casomai sfruttando nuove tecnologie automatizzate in grado comunque di abbattere in modo significativo i tempi di risposta mantenendo standard qualitativi di eccellenza.
Se è ormai chiaro, come si vedrà, che in alcuni ambiti non è più possibile oggi fare a meno della medicina molecolare, come ad esempio nella patologia virale, con particolare riferimento alla diagnostica dei virus epatotropi, neurotropi e pneumotropi, o nella patologia da micobatteri e nella diagnosi delle polmoniti atipiche, c'è viceversa tutto un ambito diagnostico in campo batteriologico, parassitologico e micologico nel quale invece, vuoi per problemi di riproducibilità e di interpretazione del risultato, vuoi per una presenza già "spinta" dell'automazione nei processi analitici che consente di ottenere in tempi brevissimi una diagnosi di elevata sensibilità e specificità, vuoi per valutazioni di costo beneficio, e ancora per la difficoltà nella rilevazione dei meccanismi di resistenza ai farmaci ancora sconosciuti, la discussione è davvero ancora molto aperta mentre l'opportunità di usufruire di tecniche molecolari va di volta in volta ponderata con grande attenzione (3, 5-7).
Mano a mano che si vanno sviluppando e affinando le diverse tecniche genotipiche si sente sempre più la relativa carenza di consolidate linee guida o *consensus* clinico gestionali per un'allocazione e un uso razionale dei test molecolari nei vari ambiti microbiologici.
In campo infettivologico la medicina molecolare trova certamente un'insostituibile collocazione in quei quadri clinici nei quali le tradizionali tecniche analitiche non sono in grado di definire una diagnosi o piuttosto non sono in grado di definirla in tempi ragionevolmente brevi.
La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) permette viceversa di amplificare in poche ore sequenze geniche specifiche di virus e in genere di tutti quei microrganismi impossibilitati a crescere in coltura o di quei *fastidious organisms* che presentano un lenta crescita che non consentirebbe al microbiologo di porre una diagnosi se non in tempi clinicamente non significativi (3-7).
Esistono dunque tutta una serie di patologie infettive legate a microrganismi con queste particolari caratteristiche biologiche che, per ottenere una diagnosi eziologica corretta, inderogabilmente richiedono oggi lo sviluppo di una diagnostica molecolare, unitamente a una formazione specifica degli operatori per una corretta interpretazione del risultato: se da un lato infatti la sensibilità dei metodi è il fiore all'occhiello della medicina molecolare, essa in un certo senso ne rappresenta anche uno dei suoi potenziali limiti, se i risultati biologici non vengono poi calati nella realtà clinica (3-5, 8, 9).
L'evidenza del nesso eziologico tra un isolato e la malattia specifica sta alla base della clinica delle malattie infettive e dell'efficacia del referto microbiologico. L'estrema sensibilità dei metodi molecolari e la loro "amplificata" capacità nel rilevare precocemente il genoma di un microrganismo deve perciò sempre essere in relazione con la specifica patologia infettiva in atto, in quanto gli esempi potenzialmente fuorvianti dei risultati molecolari in ambito infettivologico sono davvero infiniti: così come in

Tabella I. Principali criteri per la scelta di un test diagnostico

- Utilità clinica: capacità di un test di modificare la decisione del medico in senso diagnostico, prognostico e terapeutico
- Efficacia: capacità di fornire informazioni utili per la gestione del paziente
- Efficienza: capacità di raggiungere l'obbiettivo con la migliore allocazione delle risorse

Tabella II. Principali criteri per individuare l'utilità e la valenza clinica di un nuovo test diagnostico

- C'è un razionale perché il test sia richiesto dal clinico?
- Il test è utile per la salute del paziente?
- Un test più semplice può fornire informazioni equivalenti?
- Il test aumenta il livello di conoscenza clinica?
- E' possibile fare a meno del test?

corso di trattamento terapeutico possono ad esempio essere amplificati frammenti di patogeni ormai non più vitali, sono altresì segnalati in letteratura casi di colonizzazione polmonare da *Pneumocystis carinii* o da *Aspergillus spp*. in soggetti altrimenti asintomatici (8), così come è stata segnalata la presenza del DNA di *Streptococcus pneumoniae* in campioni di sangue di bambini, altrimenti asintomatici, colonizzati a livello naso-faringeo (9).
Non sempre, dunque, il dato strettamente biologico correla con la malattia da infezione e l'evidenza di colonizzazione non significa affatto malattia: problemi interpretativi, perciò, che da sempre sono alla base della valutazione clinica del referto microbiologico sono spesso oggi ulteriormente "amplificati" dalle nuove e più sensibili tecniche a disposizione.
Ciò richiede una capacità di validare il referto molecolare che non è soltanto biologica, ovvero la garanzia che si è proceduto secondo uno standard qualitativo di eccellenza, quanto il frutto di una più generale e particolare sensibilità clinica del microbiologo.

Principali applicazioni e razionali della medicina molecolare in microbiologia clinica: *one stone for many birds* ?

Fatte salve queste fondamentali premesse, è ormai acquisito che la medicina molecolare consente già oggi di intervenire in modo significativo nella diagnosi della maggior parte delle malattie virali, non solo individuandole in fase precoce e definendone in maniera molto specifica il nesso eziologico mediante il sequenziamento, ma permettendo anche di rilevare l'insorgenza di resistenze ai farmaci antivirali, mentre la quantificazione degli acidi nucleici, oggi enfatizzato dallo sviluppo della *Real Time-PCR* (RT-PCR), consente di stabilire il grado di progressione della patologia, monitorando al tempo stesso l'efficacia della terapia .
Il recente evento della "*Severe Acute Respiratory Syndrome*" (SARS) e della diagnosi della variante del *Coronavirus* ad essa correlato è stato motivo per dimostrare l'utilità dell'indagine molecolare nell'ottenere una diagnosi rapida, sensibile e specifica di un agente eziologico altrimenti difficilmente coltivabile, in modo da modulare di conseguenza la terapia in tempi ragionevolmente brevi.
In questo contesto le tecniche di diagnosi molecolare (PCR e RT-PCR), consentendo di avere la certezza immediata sia dell'avvenuta infezione ,sia degli effetti dell'eventuale terapia durante i vari stadi di malattia hanno cambiato davvero il volto della diagnostica virologica e dell'efficacia clinica del risultato microbiologico. La diagnostica biotecnologica al tempo stesso si è rivelata di estrema importanza nella determinazione della continua variabilità dei genomi virali che hanno come principale conseguenza la generazione di mutanti che sfuggono alla risposta immune e danno luogo a infezioni croniche (3-7).
Nel caso del virus dell'HCV, ad esempio , del quale fino ad oggi sono noti numerosi tipi che si suddividono a loro volta in diversi sottotipi, le tecniche molecolari, quali la valutazione dell'entità della carica virale plasmatica e la determinazione del genotipo hanno contribuito al controllo, alla stadiazione e al monitoraggio della malattia e alla modulazione del trattamento: poiché esiste una stretta correlazione tra il genotipo del virus HCV e la risposta alla terapia interferonica, la conoscenza del sottotipo infettante risulta essere in questo caso un dato fondamentale per una corretta impostazione della terapia (3,10,11).
La carica virale si è inoltre rivelata insostituibile anche nella prognosi dell'infezione da HIV, laddove la predittività sulla progressione della malattia e sull'*outcome* terapeutico è legato alla quantificazione del virus, mentre l'applicazione delle tecniche molecolari per lo studio quali-quantitativo dell'HBV ha contribuito in modo determinante al processo di conoscenza delle interazioni tra virus e ospite e dei quadri patologici che ne derivano e ha permesso altresì di valutare meglio il trattamento antivirale, verificando al tempo stesso l'eventuale riattivazione o la persistenza della malattia.
Sotto questo aspetto, inoltre, è lo sviluppo di tutta una nuova tecnologia, fatta di *microarrays* e analisi proteomica, la chiave che ci permetterà forse di capire meglio i rapporti tra il microrganismo, i suoi fattori di virulenza e le dinamiche di risposta dell'ospite arrivando forse a pensare a terapie davvero personalizzate.

Se nella diagnostica virale l'impatto clinico di un'elevata sensibilità e specificità nell'identificare l'agente eziologico e la carica infettante hanno condotto a una svolta epocale per la diagnostica microbiologica, non va altresì dimenticata la valenza prognostica del sequenziamento, strumento insuperabile e in grande evoluzione anche per la tipizzazione batterica, per il rilevamento delle resistenze e l'epidemiologia molecolare e per prevedere la risposta ai farmaci antiinfettivi, come nel caso della valutazione delle resistenze di HIV agli antiretrovirali e di HBV alla lamivudina.
Il sequenziamento consente tra l'altro, come già visto per i diversi genotipi di HCV, che esprimono diverse sensibilità nei confronti della terapia antivirale, e come accade per HBV e HIV, di correlare anche il rapporto tra genotipo e patogenicità del virus, come per esempio nel caso dell'HPV, di cui alcuni genotipi hanno un'importanza maggiore nello sviluppo del carcinoma della cervice uterina rispetto ad altri a più basso rischio di carcinogenicità.
Nella pratica clinica quotidiana, poi, uno dei campi nei quali la medicina molecolare trova uno dei suoi più razionali, pratici e dirimenti utilizzi oggi consiste nella diagnosi eziologica delle malattie virali del sistema nervoso centrale (SNC).
Le applicazioni delle più recenti evoluzioni delle tecniche molecolari, quali la RT-PCR, permettono infatti di intervenire nel giro di poche ore con un metodo sensibile e standardizzato, in patologie altrimenti difficilmente inquadrabili eziologicamente, evidenziando tra l'altro anche ampliconi diversi contemporaneamente in un ambito infettivologico, qual'è quello ad esempio delle encefaliti erpetiche o da enterovirus, nelle quali fino a non molto tempo fa era necessario ricorrere o a metodiche diagnostiche invasive, quali la biopsia cerebrale, oppure alla sierologia e agli esami colturali, con tutti i loro limiti in termini di utilità clinica.
Se, infatti, fino a pochi anni or sono l'esame colturale poteva rappresentare il *gold standard* per la diagnosi delle infezioni virali del SNC oggi, per una serie di limiti del metodo, non ultimo i tempi di risposta, non è più razionalmente pensabile procedere a una diagnosi eziologica di sospetta meningite o meningo-encefalite virale senza ricorrere alla medicina molecolare, che con la PCR trova in questo campo una delle sue più razionali e imprescindibili collocazioni, esprimendovi al meglio la sua sensibilità, specificità, rapidità, relativa semplicità ed elevata efficacia e utilità clinica (3-5,7,9,12).
La PCR, infatti, con particolare riferimento alla recente RT-PCR, si può oggi utilizzare razionalmente su campioni di liquido cerebrospinale, piuttosto che con tecniche *one-step*, preferibilmente in *Multiplex*-PCR, che con 2 o più set di *primers* specifici per diversi agenti nello stesso campione consente di ridurre i tempi di risposta e di ampliare lo spettro diagnostico, consentendo altresì di rilevare eventuali quanto rari casi di co-infezione, ad esempio da HSV e HHV6 o HSV e HBV, cambiandone in modo sostanziale la prognosi (9,12).
Un'alternativa, anch'essa commercialmente disponibile, consiste nella *Broad range* (o *Consensus*) PCR, che utilizza primers universali per sequenze conservate all'interno di una stessa famiglia, come ad esempio gli *Herpesviridae*.

Se in campo virologico oggi la medicina molecolare rappresenta ormai un imprescindibile elemento diagnostico-prognostico, in campo batteriologico, invece, il suo utilizzo è stato fino ad ora limitato dall'estrema laboriosità, dai costi elevati e in molti casi da un esiguo impatto sul TAT rispetto ai già diffusi metodi automatizzati e dalla difficoltà di identificare più ampliconi contemporaneamente, oltre al significativo problema di ottimizzare i *primers* e le condizioni di reazione e di riproducibilità.
Ancora oggi la medicina molecolare in questo ambito è collocata in una nicchia diagnostica che va però via via espandendosi mano a mano che le nuove *performance* analitiche tendono a migliorare rispetto alle già evolute tecnologie automatizzate per l'identificazione biochimica dei microrganismi e per la determinazione rapida dei test di sensibilità agli antimicrobici.
Gli ambiti nei quali oggi la medicina molecolare trova un suo razionale in batteriologia consistono perciò principalmente nella rilevazione di agenti batterici altrimenti difficilmente isolabili con i metodi tradizionali, o nei casi in cui i test diagnostici indiretti hanno obiettivamente solo un valore anamnestico, come per le spirochete (*Leptospira spp*. in particolare), o ancora quando sia necessario dimostrare gli agenti eziologici delle polmoniti atipiche, quali *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Legionella spp*., oggi proposti tra l'atro in *Multiplex*-PCR con buoni risultati in termini di sensibilità, specificità e riproducibilità.
Il microbiologo ha così la concreta possibilità di diagnosticare in tempi rapidi da sangue o da liquido di lavaggio bronco alveolare (BAL) i principali agenti eziologici batterici delle polmoniti atipiche, unitamente a tutto il corteo di virus pneumotropi, con una prospettiva di sviluppo dei *microchips arrays* che promettono di individuare in futuro un numero elevatissimo di differenti loci simultaneamente con tempi analitici relativamente brevi (8,9).
Egualmente irrinunciabili ormai si rivelano le indagini molecolari per individuare le infezioni sessualmente trasmesse da *Chlamydia trachomatis*, mentre minore interesse riveste almeno nelle nostre realtà la diagnostica di *Neisseria gonorrhoeae* e, contrariamente a quanto accade per i virus, tutta la diagnostica batteriologica delle infezioni del SNC, spesso richiesta in regime di urgenza e/o reperibilità, in relazione alla già buona sensibilità, specificità e rapidità di risposta dei metodi tradizionali microcopici, colturali e antigenici.

Anche in parassitologia per il momento è difficile trovare un concreto razionale al collocamento nella routine della medicina molecolare, sia per la già buona sensibilità e specificità di altri test oggi a disposizione del microbiologo, sia in relazione al ridotto numero di richieste che non giustifica certo costi analitici piuttosto elevati, anche se la ricerca molecolare appare promettente per certi versi soprattutto per quanto riguarda i plasmodi della malaria, le infezioni da amebe e in generale per tutta la diagnostica dei protozoi.
Per quanto concerne in particolare la diagnostica della malaria, molto spesso richiesta in regime di urgenza, pur constatando l'elevata sensibilità dei metodi molecolari soprattutto nei casi di bassa parassitemia, essa ancora non appare di diffusa applicazione, non solo per gli elevati costi gestionali, ma anche per la necessità, rispetto ai test antigenici immunocromatografici e all'esame microscopico tradizionale, di personale esperto non certo sempre disponibile, che finirebbe per procrastinare inutilmente i tempi di risposta.
Per quanto, invece, concerne l'identificazione di altri protozoi, quali ad esempio *Entamoeba histolytica*, l'indicazione all'utilizzo delle indagini molecolari si pone oggi soprattutto in particolari casi di localizzazione, ad esempio quella epatica, difficilmente accessibili con le normali tecniche diagnostiche, mentre nella localizzazione intestinale la microscopia e la successiva ricerca delle adesine consente già una precisa diagnosi eziologica in tempi relativamente rapidi senza ricorrere ad altri costosi presidi analitici quali la ricerca del DNA del protozoo.

In campo micologico la medicina molecolare trova invece particolare utilità soprattutto per quanto concerne le infezioni da *Aspergillus spp*. rilevabili da sangue, siero e BAL, sia per la particolare gravità della patologia sostenuta da *Aspergillus fumigatus* in determinate situazioni di immunodepressione che richiedono una tempestiva diagnosi eziologica, sia per la necessità di decidere in tempi relativamente brevi se intervenire con farmaci antimicotici espressamente dedicati, quali l'amfotecina B o i più recenti voriconazolo e caspofungin (13).
L'utilizzo recente della tecnica *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*-RT-PCR (NASBA-RT-PCR) consente, in termini di tempo assolutamente competitivi rispetto ai metodi colturali tradizionali, di indirizzare il clinico nella scelta terapeutica specifica per questo tipo di infezioni che nei soggetti in chemioterapia o trapiantati di midollo può avere importanza vitale (6,14).

Un capitolo a parte è costituito, invece, dalla diagnostica ormai avanzata delle infezioni da micobatteri, per i quali negli ultimi anni si è assistito in generale ad un incredibile sviluppo di metodi analitici sia colturali che molecolari (3,15).
L'introduzione delle tecniche genotipiche associate all'automazione dei sistemi colturali infatti hanno letteralmente rivoluzionato il modo di fare diagnosi in questo settore della microbiologia e la medicina molecolare è entrata ormai in quasi tutte le tappe della diagnostica della tubercolosi e delle micobatteriosi (8,9,15), dalla microscopia (con *Peptide Nucleic Acids*) alla ricerca diretta da campione tramite amplificazione, fino all'identificazione ed al monitoraggio delle resistenze del *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTB).
Pur con queste premesse incoraggianti, i metodi molecolari al momento utilizzati nella maggior parte dei laboratori, anche se standardizzati e ripetibili, rivelano però ancora qualche elemento critico rispetto alle aspettative teoriche offerte, soprattutto in termini di sensibilità, che necessita di essere valutato sempre in un contesto clinico più ampio, mentre al tempo stesso sta crescendo l'entusiasmo per le prospettive che la RT-PCR promette per il futuro.
I problemi dei falsi negativi e falsi positivi ancora presenti in diverse diffuse metodiche commerciali, legati ad alcune note interferenze analitiche, devono invitare il microbiologo a un'attenta analisi critica dei risultati alla luce di tutto un corteo di altri elementi clinico-strumentali.
Se l'algoritmo identificativo dei micobatteri non ha comunque alternativa ormai all'approccio genotipico, anche per la valutazione delle resistenze ai farmaci antitubercolari l'orientamento si volge verso un ampio sfruttamento delle tecniche molecolari, a differenza di ciò che accade per altri microrganismi per i quali il meccanismo fenotipico ha ancora una rilevanza clinica importante.
Il motivo risiede nel fatto che il MTB acquisisce la farmaco-resistenza attraverso mutazioni cromosomiche, non essendo stato dimostrato il coinvolgimento di plasmidi, transposoni o analoghi meccanismi di trasferimento della refrattarietà, mentre la resistenza è conferita da mutazioni puntiformi a singoli farmaci il cui accumulo conduce alla *Multi Drug Resistance* (MDR), cioè alla resistenza ai farmaci antitubercolari più efficaci, quali l'isoniazide e la rifampicina.
La quasi totalità dei ceppi rifampicina-resistenti, tra l'altro, correla con mutazioni in un breve segmento del gene rpoB che codifica per la subunità b della RNA polimerasi: nel caso del MTB, dunque, possiamo dire che la resistenza alla rifampicina può essere usata come marker presuntivo di MDR (3,9,15).
Tutti questi elementi insieme vanno enfatizzando l'importanza delle tecniche molecolari nella rilevazione delle resistenze ai farmaci antitubercolari, anche in relazione ai tempi di risposta estremamente ridotti rispetto a quelli ottenibili con gli antibiogrammi da sistemi di coltura radiometrici e non radiometrici di ultima generazione, soprattutto in quanto i test possono essere eseguiti sia da coltura primaria che direttamente da campione clinico, pur-

chè esso sia idoneo all'amplificazione e positivo per MTB.

Per quanto concerne, invece, la rilevazione delle resistenze ai farmaci antimicrobici di tutti gli altri più comuni patogeni batterici, la valutazione fenotipica *in vitro* conserva ancora l'elevata valenza clinica di cui si è già detto.
Pur tuttavia, nel campo delle resistenze batteriche, nuovi e promettenti sviluppi si profilano per quanto riguarda l'analisi molecolare dei principali meccanismi di refrattarietà genotipica già conosciuti, dei bassi livelli di resistenza difficilmente individuabili con i metodi fenotipici e per quanto concerne la valutazione delle sotto-popolazioni di patogeni con resistenze eterogenee e l'analisi epidemiologica molecolare dei *patterns* di resistenza.
Tutti questi elementi contribuiranno in prospettiva a sviluppare un nuovo e più efficiente sistema di *tracing* epidemiologico nel controllo delle infezioni delle strutture sanitarie (3,4,16).
La tipizzazione degli isolati sentinella provenienti da un determinato reparto si rende infatti sempre più necessaria per confermare eventuali *outbreaks* e ogni qualvolta si debba sorvegliare l'ecosistema microbico di un reparto o di un'altra realtà sanitaria. Essa viene utilizzata anche per discriminare tra infezioni recidivanti o ricorrenti in uno stesso paziente critico o ancora per stabilire la via di trasmissione di un microrganismo multiresistente (contagio orizzontale, esogeno, oppure selezione di un clone resistente nell'ambito della flora endogena).
Oggi la tecnologia molecolare offre una grande varietà di metodiche per genotipizzare gli isolati, anche se non esiste ancora un consenso unanime e linee guida condivise su quale possa essere la metodica universalmente valida nella tipizzazione dei singoli microrganismi: ogni metodica molecolare, dall'analisi del DNA plasmidico, alle tecniche di restrizione enzimatica, alla PCR, non può infatti considerarsi a tutti gli effetti discriminante, ma dovrebbe sempre essere affiancata da altri metodi di conferma (4,16-18).
Purtroppo, nonostante numerosi tentativi anche recenti di raggiungere un *consensus* in questo settore, fino ad ora ci si è dovuti arrendere al fatto che ogni microrganismo appare meglio differenziato da una tecnica piuttosto che da un'altra: la *Random Amplification Polymorphic-DNA* (RAPD) è ad esempio ideale per *Acinetobacter spp.*, così come la *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) lo è per *Pseudomonas aeruginosa*, mentre la ribotipizzazione è utile per gli stafilococchi coagulasi negativi e *la Multilocus Sequence Typing* è ideale per gli stafilococchi meticillino-resistenti (4,16,17).
L'utilizzo di tutti questi sistemi presuppone giocoforza una conoscenza delle loro caratteristiche intrinseche, delle loro potenzialità analitiche e dell'affidabilità dei risultati, mentre al tempo stesso dovrebbe essere garantita una discreta rapidità di risposta: l'epidemiologo molecolare è infatti chiamato a rispondere ad esigenze di relativa immediatezza del risultato in quanto, se fornito a distanza di settimane o mesi esso ha solo valenza epidemiologica, ma non consente di intervenire nella soluzione di episodi di *outbreaks*.
La tipizzazione microbica, ovvero la possibilità di caratterizzare un isolato batterico, di definirne presuntivamente le relazioni con gli altri isolati dello stesso paziente o di pazienti ricoverati in una stessa realtà, rappresenta dunque una sfida avvincente per il microbiologo clinico, oltre a rappresentare una tra le problematiche di maggiore attualità in campo infettivologico e molecolare, soprattutto nell'ambito dello sviluppo della sorveglianza delle infezioni nelle strutture sanitarie, il cui monitoraggio si sta facendo con gli anni via via sempre più complesso e affascinante.
Le metodiche fenotipiche fino ad oggi utilizzate si sono rivelate purtroppo spesso scarsamente discriminanti, essendo afflitte da notevoli variabili a seconda, ad esempio, dell'espressione o repressione di un determinato gene. Per questo, lo sviluppo del *tracing* molecolare presenta una prospettiva di grande interesse in campo epidemiologico, anche se allo stato attuale non esiste una sufficiente riproducibilità dei metodi, sia per variabili intrinseche che per problemi di formazione degli operatori. Purtroppo, infatti, al fiorire di svariate metodologie analitiche non ha fatto sempre seguito una parallela crescita delle conoscenze dei sanitari e una standardizzazione dei metodi, mentre l'interpretazione dei dati ottenuti è in mano a operatori che spesso non sono in grado di interpretare clinicamente il risultato analitico ottenuto: la figura del medico epidemiologo molecolare è ancora una chimera ed è spesso già guardata con sospetto, ma nella realtà futura questi professionisti dovranno sempre maggiormente farsi carico di interagire con i clinici e conoscere adeguatamente le metodiche che possono essere utili nell'identificazione e nella tipizzazione microbica, ed essere in grado al tempo stesso di calare i risultati nella propria realtà e capaci di discutere e proporre eventuali adeguati interventi correttivi alle situazioni critiche contingenti.
L'epidemiologia molecolare, dunque, appare come una disciplina in grande evoluzione, certamente non eseguibile da qualunque laboratorio e comunque ancora in bilico tra la ricerca biologica fine a se stessa e la microbiologia clinica applicata.
Anche in questo caso solo la concreta integrazione tra evidenza clinico-epidemiologica ed evidenza genotipica e/o fenotipica, quindi la fattiva collaborazione e il continuo scambio informativo tra clinico e microbiologo, possono fornire risultati validi per il controllo degli *outbreaks* di infezioni in strutture sanitarie e in generale per un utilizzo clinicamente utile e razionale della medicina molecolare in questo campo.

Mai come in questo momento il microbiologo clinico si è trovato di fronte a una così vasta offerta di nuove possibili strategie diagnostiche: la filosofia molecolare offre, come appare evidente, innumerevoli stimolanti applicazioni in diversi settori della microbiologia clinica (*one stone for many birds…*), ma tutto questo deve razionalmente essere collocato nel tessuto organizzativo, clinico ed epidemiologico della realtà in cui si opera, analizzando concretamente e criticamente le potenzialità esprimibili dal proprio laboratorio, non solo in termini di *budget* e di capacità tecniche del personale, ma anche di efficienza operativa in grado di consentire di operare in continuo per meglio sfruttare le opportunità offerte in termini di minore TAT dalla nuova tecnologia molecolare e automatizzata in genere. Su tutti questi aspetti specifici mancano ancora linee guida clinico gestionali in grado di orientare davvero il microbiologo in mezzo a tutta una serie di quesiti e percorsi diagnostico-organizzativi che scuotono la filosofia dell'attuale diagnostica microbiologica e dell'organizzazione gestionale del laboratorio di microbiologia.
Al microbiologo spetta il difficile onere di intervenire per attuare la migliore integrazione tra le metodiche ormai consolidate e le più recenti tecnologie e lo sforzo per accrescere in prospettiva l'impatto clinico del referto molecolare, attraverso una maggiore appropriatezza delle richieste e una sempre migliore efficacia della risposta.

Bibliografia

1. Camporese A, Li Bergoli M. Il cambiamento del microbiologo: dalla visione "biologica" alla visione "clinica". Riv Med Lab – JLM 2002; 2-S1: 116-20.
2. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. J Clin Microbiol 1994; 32: 1757-62.
3. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Ed, VII edizione; 1999.
4. Lorelei W, Miller C, Vollmer D, Canter D, Radtkey R, Nerenberg M, O'Connell JP. Antimicrobial Resistance and Bacterial Identification Utilizing a Microelectronic Chip Array. J Clin Microbiol 2001; 39: 1097-104.
5. Richardson H, Smaill F. Recent advances in Medical microbiology. BMJ 1998; 317:1060-2.
6. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 465-84.
7. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious disease. Clin Infect Dis 1999; 29: 475-88.
8. Ieven M, Goossens H. Relevance of Nucleic Acid Amplification Techiques for Diagnosis of Respiratory Tract Infections in the Clinical Laboratory. Clin Microbiol Rew 1997;10: 242-56.
9. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious disease. Canadian Medical Association Journal 2000; 163: 301-9.
10. Enomoto M, Nishiguchi S, Shiomi S, Tanaka M, Yokogawa T, Fukuda K, et al. Changes in serum levels of Hepatitis C Virus genotype 1b monitored by real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of long term response to interferon-a treatment. Am J of Gastroenterol 2002; 97: 420-5.
11. Irving WL. The role of the virology laboratory in the management of hepatitis C virus infection. J Clin Microbiol 2002; 25:3-13.
12. Freddricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious disease. Clin Infect Dis 1999; 29: 475-88.
13. Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Wang Z, Wang D. Identification of *A. fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol 2001; 39: 2261-6.
14. Deiman B, van Aarle O, Sillekens P. Characteristic and applications of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA). Molecular Biotechnology 2002; 20: 163-76.
15. Woods GL. Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 1002-6.
16. Weber S, Pfaller MA, Herwaldt LA. Role of molecular epidemiology in infection control. Infect Dis Clin North Am 1997; 11:257-75.
17. Pfaller MA. Molecular epidemiology in the care of patients. Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 1007-10.
18. Maslow J, Mulligan ME. Epidemiologic typing systems. Infect Control Hosp Epidemiol 1996; 17: 595-604.