

L'attività 2018 dell'Unità Operativa di Microbiologia nell'ambito della certificazione di idoneità alla donazione di organi solidi e tessuti per i TRAPIANTI

L'UO di Microbiologia contribuisce in maniera sostanziale alle attività di trapianto dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico S. Orsola-Malpighi, conducendo un'intensa, continuativa e qualificata attività rivolta soprattutto verso:

- 1) Gli accertamenti di laboratorio per certificare l'idoneità "microbiologica" dei potenziali donatori
- 2) Gli accertamenti di laboratorio per l'ottimale gestione dei pazienti trapiantati in tutte le fasi post-operatorie
- 3) La ricerca e la formazione specifica del settore

1) LA CERTIFICAZIONE DI IDONEITÀ "MICROBIOLOGICA" DEI POTENZIALI DONATORI

Nel corso del 2018 l'UO ha proseguito nelle attività di valutazione di idoneità microbiologica dei potenziali donatori garantendo l'esecuzione di un ampio pannello di indagini sierologiche, virologiche (Tabella 1) e microbiologiche.

Tabella 1: Le indagini effettuate

Test sierologici eseguiti in urgenza	Test molecolari eseguiti in urgenza	Test sierologici e molecolari eseguiti subito dopo trapianto
Anticorpi anti <i>T. pallidum</i> : test CMIA (IgG+IgM) test TPHA e test RPR	HIV-RNA Real Time (NAAT)	Anticorpi anti CMV (IgG+IgM)
Anticorpi anti-HIV 1 e 2 & antigene HIV 24 (test HIV combo)	HCV-RNA Real Time (NAAT)	Anticorpi anti <i>Toxoplasma gondii</i> (IgG)
	HBV-DNA Real Time (NAAT)	Test di avidità delle IgG anti CMV e IgG anti <i>T. gondii</i>
Anticorpi anti-HBs	CMV-DNA Real Time	Anticorpi anti HSV 1 e 2 anti VZV (IgG)
Antigene HBs	EBV-DNA Real Time	Anticorpi anti EBV (VCA ed EBNA) (IgG)
Anticorpi totali anti-HBc	HSV 1 e 2 -DNA Real Time	Anticorpi anti HHV8 (IIF)
Anticorpi anti-HBc (IgM)	VZV-DNA Real Time	Anticorpi anti WNV (IIF, IgG e IgM)
Anticorpi anti-HBe	HHV6-DNA Real Time	Anticorpi anti HIV 1/2 (IB)
Antigene HBe	HHV8-DNA Real Time	HBV-DNA, HCV-RNA e HIV-RNA PCR Real Time quantitativa
Anticorpi anti-HBe	Enterovirus-RNA Real Time	Anticorpi anti HCV (Immunoblot, IgG)
Anticorpi anti HCV IgG		HCV genotipi
Anticorpi totali anti-HDV		Anticorpi anti <i>T. pallidum</i> (IB, IgG)
Anticorpi anti-HDV (IgM)		HERPESVIRUS-DNA PCR Real Time
Antigene HDV		West Nile Virus-RNA Real Time (NAAT)
		Anticorpi anti <i>T. cruzi</i> (Chagas) IgG
Test microbiologici: Esami colturali per ricerca di batteri e miceti, identificazione rapida dei microrganismi e antibiogrammi.		

Questa attività, svolta in un servizio di pronta disponibilità **24 ore su 24**, ha garantito il controllo microbiologico di tutti i potenziali donatori della Regione Emilia Romagna. I dati analitici relativi a questa attività sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2: Risultati complessivi dell'attività svolta dall'Unità Operativa di Microbiologia nell'ultimo biennio

	2017	2018
N. richieste pervenute e soddisfatte	232	234
N. totale indagini eseguite	1090	1171
<i>RNA-HIV (NAAT)</i>	<i>143</i>	<i>139</i>
<i>RNA-HIV test quantitativo</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
<i>RNA-HCV (NAAT)</i>	<i>143</i>	<i>139</i>
<i>RNA-HCV test quantitativo</i>	<i>2</i>	<i>1</i>
<i>RNA-HCV genotipo</i>	<i>2</i>	<i>0</i>
<i>DNA-HBV (NAAT)</i>	<i>143</i>	<i>139</i>
<i>DNA-HBV test quantitativo</i>	<i>2</i>	<i>8</i>
<i>RNA- West Nile Virus (NAAT)</i>	<i>152</i>	<i>99</i>
<i>DNA-CMV</i>	<i>2</i>	<i>1</i>
<i>DNA-HHV8</i>	<i>1</i>	<i>0</i>
<i>RNA-Enterovirus</i>	<i>2</i>	<i>0</i>
N. totale indagini molecolari eseguite	593	527
N. test positivi Ab anti HBc tot	8	11
N. test positivi IgM anti HBc	0	0
N. test positivi HBsAg	0	1
N. test positivi Ab anti HCV	1	0
N. test positivi Ab anti HIV 1 -2 e Ag p24	0	0
N. test positivi <i>T. pallidum</i> - test di screening	0	1
N. test positivi Ab anti HHV8	1	0
N. test positivi per emocolture batteri	4	5

Attività in urgenza

Come si può osservare in Tabella 2, nel 2018 si è avuto un incremento sia del numero di richieste pervenute alla UO di Microbiologia e da essa soddisfatte (1%) e sia del numero di indagini eseguite (7.5%), (si vedano anche le Figure n. 1 e n. 2).

Nel 2018 è stato invece osservato un leggero decremento degli esami molecolari, in particolare sono stati eseguiti 527 test molecolari, circa il 10% in meno rispetto a quelli eseguiti nel 2017 (Tabella 2); di questi 417 (79.1%) sono state effettuati in urgenza.

In generale, dei 527 test molecolari, 417 (79.1%) sono stati effettuati per la ricerca del DNA di HBV e dell'RNA di HCV e HIV; 99 (18.8%) per la ricerca di RNA-West Nile Virus (Tabella 2).

Centotrentanove sono stati i potenziali donatori di organi e tessuti i cui campioni di sangue sono stati esaminati in urgenza per la ricerca dei genomi di HIV, HBV e HCV. In regione Emilia Romagna, al fine di ottenere una maggiore sicurezza microbiologica dei donatori, l'esecuzione di questa tipologia di indagini è richiesta in urgenza su tutti i donatori di organi-tessuti e totalmente concentrata presso la UO di Microbiologia di Bologna. Di fatto, anche l'ultima versione delle linee guide diffusa dal CNT (gennaio 2017) include queste indagini supplementari esclusivamente qualora l'anamnesi, l'esame obiettivo e/o i risultati dei primi esami di laboratorio abbiano fatto emergere dubbi sull'idoneità alla donazione. Tutti i 139 potenziali donatori di organi-tessuti sono risultati negativi alla ricerca del genoma di HIV; quattro dei 139, sono risultati positivi per la ricerca del DNA di HBV e 3 per la ricerca di HCV-RNA. In tutti questi casi, la donazione è stata selezionata con una classe di rischio non standard, che ha permesso di identificare con appropriatezza i riceventi seguendo le linee guida del CNT e le raccomandazioni del Ministero della Salute.

Figura 1: Numero richieste pervenute e soddisfatte nel periodo 2002-2018

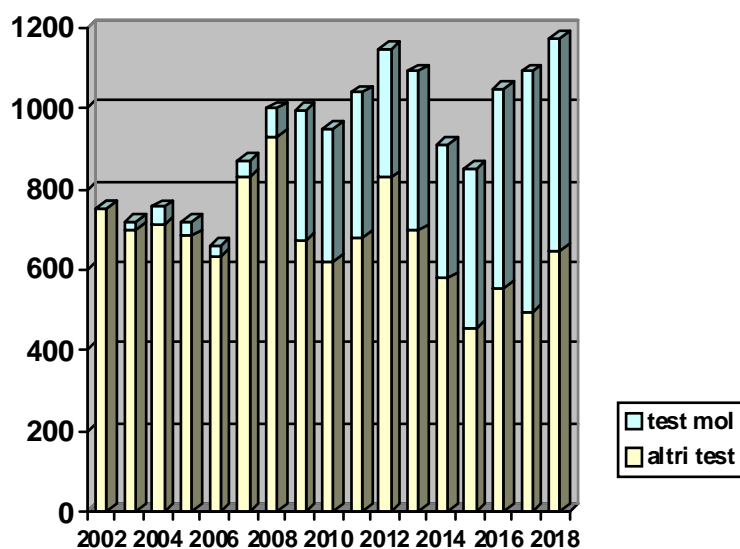
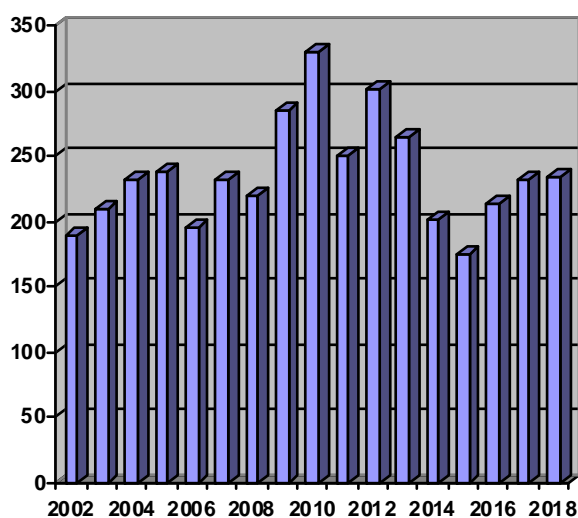


Figura 2: Numero di analisi eseguite nel periodo 2002-2018

Donatori marginali

Se poniamo attenzione ai dati relativi ai donatori positivi per le infezioni da Virus dell'Epatite B (vedi Tabella 2), osserviamo che 11 campioni sono risultati positivi per la ricerca di anticorpi totali anti core e nessuno di questi è risultato positivo per la ricerca delle IgM anti HBc. Su quarantaquattro donatori controllati per l'HBsAg, uno è risultato positivo. I successivi test sierologici eseguiti per evidenziare una potenziale super-infezione con il Virus dell'Epatite Delta sono risultati negativi. Questi dati evidenziano un'accettazione di donatori idonei a rischio non standard, in questi casi per la presenza di marcatori sierologici positivi per i Virus delle epatiti primarie.

Infine, un donatore è risultato positivo per la ricerca di anticorpi *Treponema pallidum*-specifici (CMIA IgG+IgM e TPHA) e negativo ai test non treponemici (RPR), evidenziando una sieropositività anticorpale in assenza di un'infezione attiva.

Casi particolari

1. Stabile è risultata la positività unica di anticorpi diretti verso l'antigene di superficie di HBV (HBsAg), confermando la presenza, tra i donatori, di soggetti vaccinati.
2. Per quanto riguarda gli altri test sierologici rilevatisi positivi, essi si sono mantenuti entro numeri fisiologici e riguardano soprattutto la presenza di anticorpi della classe G (IgG) anti Citomegalovirus (CMV), anti *Toxoplasma gondii* (TOXO) e anti Epstein Barr Virus (EBV).
3. Nel corso del periodo di sorveglianza dell'infezione da WNV (15 giugno – 30 novembre 2018) sono stati controllati 93 donatori di organi-tessuti residenti in regione Emilia Romagna (o che avevano trascorso almeno una notte negli ultimi 28 giorni prima della donazione); tutti i campioni sono risultati negativi.

Oltre ai donatori della regione Emilia Romagna sono stati controllati per la ricerca di RNA-WNV, 6 donatori di organi-tessuti provenienti dalla regione Toscana. Anche in questo caso nessun donatore è risultato positivo.

Queste valutazioni sono state eseguite dall'UO di Microbiologia come da indicazioni del CNT anche per l'anno 2018, infatti il protocollo d'intesa ha indicato a tutte le regioni non in grado di attuare una sorveglianza per WNV dei donatori con metodo molecolare, di fare riferimento ai laboratori di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna e dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Padova e ai laboratori di Virologia dell'Istituto Nazionale Malattie Infettive "L. Spallanzani" di Roma sulla base della contiguità geografica e di rapporti di collaborazione.

Quest'attività è stata svolta con tempi di esecuzione entro le 72 ore dalla donazione, in quanto lo stesso CNT ha stabilito che la positività alla viremia WNV non si deve considerare un elemento bloccante la donazione (Clin Infect Dis 2010, 51:e34-7).

4. L'ultima revisione delle linee guida (gennaio 2017) dedicate ai "Criteri generali per la valutazione di idoneità del donatore" ha ribadito l'obbligatorietà di eseguire in h24, la ricerca del DNA di HSV 1-2, VZV, HHV-6, CMV, EBV ed RNA di Enterovirus e WNV (quest'ultimo solo durante il periodo di sorveglianza) nei campioni di sangue e di liquido cefalo-rachidiano provenienti da potenziali donatori con diagnosi o sospetto clinico di meningite e/o encefalite di origine virale. Nel 2018 non è pervenuta alcuna richiesta.
5. Qualora l'anamnesi, l'esame obiettivo o i risultati di esami di laboratorio facciano emergere un sospetto di infezione/malattia da HEV, la valutazione microbiologica del

donatore deve essere completata con la ricerca dell'RNA di HEV da eseguire entro le 24 ore dalla donazione. Nel 2018 non è pervenuta alcuna richiesta.

Estensione dello screening

Dal 2005 in poi lo screening con test molecolari è stato esteso ai donatori di sole cornee e alle donatrici di cordoni ombelicali. Nel 2018 in totale sono stati eseguiti 3068 esami per la validazione microbiologica e dei quali 1597 (52%) sono i test molecolari eseguiti per la ricerca di HIV, HCV, HBV, HHV6, HTLV I-II.

Tutti i campioni esaminati con i test molecolari sono risultati negativi per la ricerca dei diversi genomi virali, tranne 15 campioni (0.9%) positivi per la ricerca del DNA di HBV, 1 per la ricerca dell'RNA di HCV ed 1 per la ricerca del DNA di HHV6.

Sempre per le donazioni di cornea l'UO di Microbiologia ha completato la valutazione d'idoneità microbiologica eseguendo 53 colture per la ricerca di batteri, in aerobiosi ed anaerobiosi, e miceti; di questi test sono risultati rispettivamente positivi 9 campioni per gli aerobi e 9 per gli anaerobi. Quattrocentocinquantadue sono i liquidi di conservazione delle cornee esaminati con le prove di sterilità e di questi 108 (23.8%) sono risultati positivi.

Settantotto sono state le successive identificazioni batteriche e 37 gli antibiogrammi eseguiti.

2) LA GESTIONE DEI PAZIENTI TRAPIANTATI IN TUTTE LE FASI POST-OPERATORIE

Oltre a tutta l'attività condotta per l'accertamento di idoneità microbiologica, l'UO di Microbiologia svolge in routine una continuativa attività diagnostica, che non compare in questo report e che fornisce ai clinici dati fondamentali per prevenire e controllare i due fattori che condizionano fortemente l'evoluzione clinica del trapianto: il rigetto e le infezioni. Essi sono i due principali ostacoli al successo del trapianto, a breve e a lungo termine, e sono due processi intimamente associati e interdipendenti.

3) RICERCA E FORMAZIONE SPECIFICA

Quanto riassunto nei punti precedenti, necessita ed è il risultato di un continuo avanzamento nelle conoscenze scientifiche (documentato da una costante e significativa attività scientifica, ben riconosciuta in campo nazionale ed internazionale), potenziamento delle risorse economiche e umane impegnate in tali compiti, attivazione di progetti di ricerca specifici.

L'UO di Microbiologia insieme ai centri di trapianto fegato e polmone del Policlinico S. Orsola-Malpighi, ha partecipato dal 2014 al 2016 al progetto Ccm (Centro nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie) dal titolo "Prevenzione della diffusione di infezioni sostenute da microrganismi multiresistenti (MDR) in ambito trapiantologico e analisi del rischio", progetto coordinato dal Centro Nazionale Trapianti. I risultati di questo studio, prospettico e multicentrico sono stati oggetto delle seguenti pubblicazioni:

Gagliotti C et al. Infections in liver and lung transplant recipients: a national prospective cohort. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018; 37:399-407.

Errico G et al. Colonization and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in liver and lung transplant recipients and donor-derived transmission: a prospective cohort study conducted in Italy. Clin Microbiol Infect. 2019; 25:203-209.

L'UO di Microbiologia ha partecipato alla stesura della terza edizione delle linee internazionali per la gestione dell'infezione da Citomegalovirus nei pazienti trapiantati d'organo solido, *Kotton CN et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. Transplantation 2018; 102:900-31.*

E' stata inoltre parte integrante in altri due studi internazionali:

Robert-Gangneux F et al. Toxoplasmosis in Transplant Recipients, Europe, 2010-2014. Emerg Infect Dis 2018; 24:1497-1504.

Chiereghin A et al. Monitoring of Cytomegalovirus (CMV)-Specific Cell-Mediated Immunity in Heart Transplant Recipients: Clinical Utility of the QuantiFERON-CMV Assay for Management of Posttransplant CMV Infection. J Clin Microbiol 2018; 56.

Infine, l'UO di Microbiologia è parte attiva di una rete di 21 laboratori italiani di Microbiologia e Virologia, denominata GLaIT "INFEZIONI nel TRAPIANTO" e promossa dall'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI). La rete si è costituita nel 2008 con gli obiettivi di migliorare le conoscenze scientifiche in tema di agenti infettivi e trapianto e di avere una maggiore uniformità degli strumenti utilizzati nella diagnosi e monitoraggio delle infezioni nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido e di cellule staminali emopoietiche. Particolare attenzione è stata posta nel promuovere una stretta collaborazione tra microbiologi e clinici coinvolti nell'attività trapiantologica al fine di condividere e formulare in ambito nazionale percorsi diagnostico-assistenziali. A tale scopo il GLaIT ha attivato un gruppo di lavoro multidisciplinario, costituito dal Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo (GITMO), dalla Società Italiana dei Trapianti d'Organo (SITO) e dalla Società Italiana di Malattie Infettive e Tropicali (SIMIT). Tutte le attività intersocietarie realizzate sono state sempre presentate ai congressi nazionali organizzati da ciascuna società scientifica e sottoposte a pubblicazioni nazionali ed internazionali tra le quali: *Lazarotto T et al. Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus DNA Kinetics in Whole Blood and Plasma of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. Biol Blood Marrow Transplant 2018; 24:1699-1706.*

Prof.ssa Maria Carla Re

Bologna, 7 marzo 2019