

## L'AUXONOGRAMMA DI *NEISSERIA GONORRHOEAE* COME SISTEMA DI INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

F. CAPRILLI, E. CRESCIMBENI, G. PRIGNANO e C. LATELLA

Laboratorio di Microbiologia, Istituto Ospitaliero Dermosifilopatico di S. Maria e S. Gallicano, Roma

**Riassunto.** — *Le ricerche sulla diffusione dell'infezione gonococcica nell'ambito della popolazione richiedono un metodo appropriato di indagine epidemiologica. La tipizzazione dei ceppi di Neisseria gonorrhoeae isolati dai casi clinici può essere effettuata secondo Catlin [1] con una serie di 11 terreni chimicamente definiti: il quadro di crescita identifica l'auxotipo. Applicando questa metodica a 200 ceppi di N. gonorrhoeae abbiamo trovato 29 auxotipi, la cui distribuzione percentuale appare differente da quella riscontrata negli Stati Uniti, Canada e negli stati del nord Europa. Un cenno particolare merita l'osservazione che tra i 9 ceppi di N. gonorrhoeae  $\beta$ -lattamasi produttori da noi isolati, tutti di provenienza asiatica o africana, 7 appartengono all'auxotipo PRO-, che non cresce in assenza di L-prolina. Il rapporto tra l'auxotipo e il livello di sensibilità alla penicillina ha dimostrato che i ceppi prototrofi sono per la maggior parte mediamente sensibili, mentre i fenotipi PRO-, PRO-ARG-, ARG- posseggono una resistenza elevata a questo antibiotico.*

**Summary** (*Neisseria gonorrhoeae* auxotyping as a system of epidemiological studies). — *Studies of the spread of gonococcal infection among the population require appropriate methods of epidemiological investigation. A set of 11 chemically defined media has been used to type Neisseria gonorrhoeae strains, obtained from clinical specimens: the growth pattern identifies the auxotype. Applying this method to 200 isolates of N. gonorrhoeae, we found 29 auxotypes. Their distribution differs from that found in the United States, Canada and north European countries. It is to be remarked that 7 out of 9 isolates of  $\beta$ -lactamase producing N. gonorrhoeae, all of Asiatic or African origin, belong to the PRO- group. A correlation between the different auxotypes and their susceptibility to penicillin was noted; most of the prototrophic strains exhibit a medium degree of sensitivity, whereas the PRO-, PRO-ARG- and ARG-auxogroups show a great resistance to this antibiotic.*

### Introduzione

Studi epidemiologici sulla gonorrea sono stati resi possibili dall'osservazione di Catlin [1] che i ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* possono avere diverse richieste nutrizionali e che perciò possono essere differenziati secondo le specifiche esigenze in aminoacidi, basi e vitamine durante la crescita in un terreno chimicamente definito. Tali ceppi vengono classificati come auxotrofi, in contrapposizione ai ceppi prototrofi che non richiedono tali sostanze per la crescita [2].

L'auxotipo è una caratteristica stabile ed ereditaria di un ceppo [1,3] e ciò sembra legato ad una mutazione genetica che è responsabile del difetto biosintetico nell'elaborazione di un dato aminoacido.

E' per tale ragione che l'auxonogramma ha assunto un grande valore negli studi epidemiologici della gonorrea.

Tuttavia la complessità del metodo ne ha limitato l'uso: solamente pochi lavori sono reperibili su tale argomento e riguardano gli auxotipi trovati in USA, Canada, Inghilterra, Svezia, Olanda e Francia [1,4-12].

Peraltro, è stato notato che esistono variazioni geografiche nella distribuzione dei diversi auxotipi.

In questo lavoro sono riportati i risultati della tipizzazione con il metodo di Catlin di 200 ceppi isolati nel nostro laboratorio da pazienti blenorragici, allo scopo di evidenziare, per la prima volta in Italia, la distribuzione degli auxotipi di *N. gonorrhoeae* circolanti fra la popolazione sessualmente attiva in Roma.

### Materiali e metodi

*Ceppi di Neisseria gonorrhoeae:* 200 ceppi sono stati ottenuti da pazienti maschi affetti da uretrite anteriore acuta blenorragica, strisciando la secrezione su terreno di Caprilli e Ortali [13] e incubando a 37 °C per 48 ore in candle jar.

I ceppi di diplococchi gram-negativi e ossidasi positivi sono stati identificati con il metodo della fermentazione.

tazione degli zuccheri in CTA Medium BBL con aggiunta di dischetti imbevuti di destrosio, maltosio, saccarosio e mannite (Taxo Carbohydrate Discs BBL).

*Auxonogramma:* i ceppi sono stati coltivati per 48 ore in *candle jar* su 11 terreni chimicamente definiti, preparati secondo le formule di Catlin [1,2].

La serie comprende un terreno completo (NEDA = *Neisseria defined agar*) e 10 terreni preparati nello stesso modo, ad eccezione di alcuni componenti omissi o aggiunti (Tab. 1).

Tabella 1. — *Set di 11 terreni colturali chimicamente definiti per la determinazione dell'auxotipo dei ceppi di Neisseria gonorrhoeae*

Designazione	Composti omissi dal NEDA	Composti aggiunti al NEDA
NEDA (a)	nessuno	nessuno
-CIS	L-Cysteina HCl L-Cistina Glutazione	nessuno
-PRO	L-Prolina	nessuno
-ARG	L-Arginina HCl	nessuno
-MET	L-Metionina	nessuno
-HYX	Ipoantina	nessuno
-URA	Uracile	nessuno
-V	Miscela di vitamine (b)	nessuno
-V+THI	Miscela di vitamine (b)	Tiamina HCl
-V+ThPP	Miscela di vitamine (b)	Tiamina pirofosfato
-ARG+ORN	L-Arginina HCl	L-Omitina HCl

(a) Composizione del NEDA (*Neisseria defined agar*) e degli altri terreni in Catlin [1,2]

(b) Emina, nicotinamide-adenin-dinucleotide, tiamina-HCl, pantotenato di calcio, colina-HCl, mio-inositolo, biotina e tiamina-pirofosfato

Prima dell'esecuzione del test i ceppi sono stati coltivati sul terreno di isolamento in modo da ottenere larghe patine del germe. La patina batterica è stata sospesa in 5 ml di soluzione fisiologica fino ad ottenere una torbidità pari al n. 1 della scala di Mac Farland. Ciascuna sospensione è stata usata immediatamente, strisciandone uniformemente un'ansa (ansa di platino del diametro di mm 2) su ognuno degli 11 terreni della serie auxonografica. L'inoculo è stato incubato in *candle jar* per 48 ore a 37 °C. Al termine di questo periodo l'entità della crescita su ognuno dei terreni utilizzati è stata confrontata con quella del terreno NEDA completo.

E' stata considerata "0" la mancata crescita di un ceppo su un dato terreno della serie, oppure la crescita sotto forma esclusiva di microcolonie, inferiori a 0,2 mm di diametro, oppure la crescita di meno di 5 colonie su un dato terreno, mentre sul NEDA erano presenti numerose colonie.

E' stata valutata «+» la crescita su un determinato terreno della serie simile a quella presente sul NEDA.

*Sensibilità alla penicillina:* per ogni ceppo è stata determinata la concentrazione minima inibente (MIC) della penicillina G (penicillina G sodica, Farmitalia),

utilizzando come terreno base il Thayer-Martin, con aggiunta dell'antibiotico alle concentrazioni finali di 0,01, 0,06, 0,25, 1,0, 4,0 µg/ml. Sulla superficie di ogni piastra antibiotizzata è stato strisciato, mediante un'ansa calibrata, 0,1 µl di una torbidità corrispondente al valore 1 della scala Mac Farland.

Le piastre sono state incubate per 48 h a 37 °C in *candle jar*. La MIC corrispondeva alla più bassa concentrazione di antibiotico che inibiva la crescita di un determinato ceppo.

*Produzione di penicillinasi:* è stato utilizzato il metodo che rileva la produzione dell'enzima β-lattamasi da parte dei ceppi di *N. gonorrhoeae* mediante l'idrolisi della benzil-penicillina ad acido penicilloico, svelata da un indicatore di pH (Beta-lactamase detection papers, Oxoid).

## Risultati

La distribuzione in auxotipi di 200 ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* isolati nel nostro laboratorio è riportata nella Tab. 2.

Il fenotipo più frequente (68%) è lo "zero", che comprende i ceppi prototrofi, i quali, crescendo indif-

Tabella 2. — *Auxotipi di 200 ceppi di Neisseria gonorrhoeae isolati in Roma*

Auxotipo	Fenotipo (a)	N. ceppi	% dei ceppi
1	Zero	136	68
2	PRO	20	10
3	PRO, ARG	5	2,5
4	PRO, ARG, V, Thi	1	0,5
5	PRO, ARG, ORN	1	0,5
6	PRO, ARG, ORN, URA	1	0,5
7	PRO, MET, V	1	0,5
8	PRO, HYX	1	0,5
9	PRO, HYX, URA	1	0,5
10	PRO, URA	2	1
11	PRO, V	1	0,5
12	PRO, V, Thi	1	0,5
13	ARG	4	2
14	ARG, MET	1	0,5
15	ARG, MET, V, Thi	1	0,5
16	ARG, MET, HYX, ORN	1	0,5
17	ARG, V	1	0,5
18	MET	1	0,5
19	MET, HYX, V, Thi	1	0,5
20	MET, V, Thi	1	0,5
21	HYX	5	2,5
22	URA	2	1
23	URA, ORN	1	0,5
24	V	1	0,5
25	V, Thi	2	1
26	V, Thi, ThPP	3	1,5
27	V, ThPP	2	1
28	V, ThPP, ORN	1	0,5
29	ORN	1	0,5

(a) cfr. Tab. 1.

ferentemente su tutti i terreni della serie auxonografica, dimostrano di non avere esigenze specifiche per la crescita.

Il rimanente 32% è costituito da 28 diversi auxotipi, che non crescono in assenza di uno o più aminoacidi, basi puriniche o pirimidiniche e vitamine.

La Tab. 3 mostra le differenze fra gli auxotipi più importanti, secondo la loro origine geografica. E' evidente che la distribuzione degli auxotipi in Roma rispecchia una situazione locale, per molti versi lontana dal quadro auxonografico che si osserva nei paesi del nord-America e del nord-Europa, influenzato sempre più dalla diffusione di ceppi  $\beta$ -lattamasi produttori e resistenti alla penicillina.

La Fig. 1 mostra come è distribuita la MIC della penicillina all'interno dei gruppi dei prototrofi e degli auxotrofi da noi isolati.

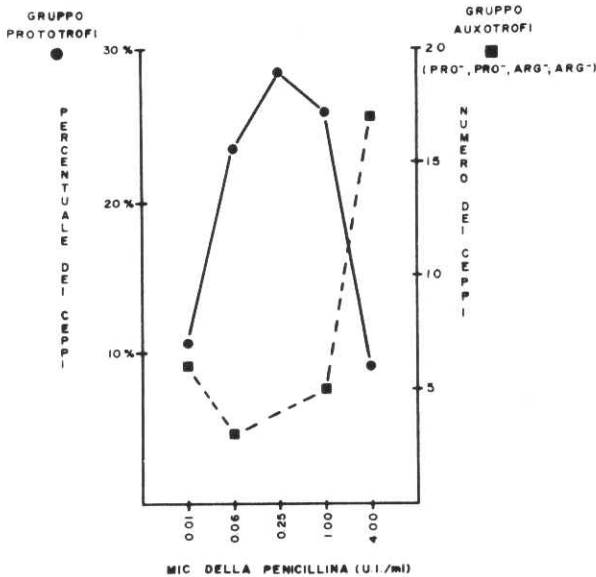


Fig. 1 - Minima concentrazione inibente della penicillina dei ceppi prototrofi e auxotrofi (PRO<sup>-</sup>; PRO<sup>-</sup>, ARG<sup>-</sup>; ARG<sup>-</sup>)

Il grafico dimostra una sensibilità alla penicillina concentrata intorno ai valori medi per quanto riguarda i ceppi prototrofi e ai valori massimi (resistenza) per gli auxotipi PRO<sup>-</sup> e ARG<sup>-</sup>, conformemente a quanto è già conosciuto in letteratura.

Le differenze sostanziali con gli altri paesi, rilevate dal nostro lavoro, riguardano soprattutto le frequenze relative degli auxotipi, come abbiamo più sopra accennato.

## Discussione

Il presente lavoro è stato condotto allo scopo di stabilire la frequenza relativa degli auxotipi di 200 ceppi di *N. gonorrhoeae* isolati in Roma, Italia.

La conoscenza della frequenza dei diversi auxotipi è un requisito essenziale per ulteriori studi diretti al

controllo dei cambiamenti genetici entro la popolazione gonococcica di una data area geografica.

Dei vari metodi a disposizione [4], noi abbiamo scelto quello sviluppato da Catlin [1,2], perché, seppure complesso, permette facilmente di confrontare i nostri dati con quelli di altri autori. Da questo confronto nasce l'evidenza della differente distribuzione geografica degli auxotipi.

In primo luogo risalta l'elevata frequenza di ceppi prototrofi (68%) in Roma, più vicina ai dati francesi (51,4%) [10] che a quelli delle altre aree europee e americane (Tab. 3).

Al contrario è assai contenuta la percentuale dei ceppi auxotrofi nella nostra regione (32%), anche in questo caso più vicina ai valori trovati a Strasburgo (48,6%) [10] che a quelli segnalati nelle altre aree geografiche. Gli auxotipi che sembrano avere maggiore importanza in tutti i paesi sono: i PRO<sup>-</sup>, gli ARG<sup>-</sup> e gli ARG, HYX, URA<sup>-</sup>.

In Roma i ceppi PRO<sup>-</sup> rappresentano il 10% degli auxotipi, gli ARG<sup>-</sup> il 2%, i PRO, ARG<sup>-</sup> il 2,5% mentre sono totalmente assenti i tipi ARG, HYX, URA<sup>-</sup>. Questa distribuzione si discosta sensibilmente da quella delle altre aree del mondo.

Tenendo pur conto della parcellizzazione dei rimanenti auxotipi (sono stati identificati, oltre ai prototrofi, 28 auxotipi diversi), la PRO e l'ARG dipendenza è presente, in un modo o nell'altro, nel 67% dei ceppi auxotrofi (Tab. 2).

Da questi dati emerge perciò un aspetto peculiare della distribuzione degli auxotipi, quale non si riscontra neppure in Francia: ciò fa pensare ad una origine essenzialmente locale dei ceppi.

Tale distribuzione assume maggiore significato se si tiene conto che 7 dei 9 ceppi  $\beta$ -lattamasi produttori da noi isolati, appartenenti al tipo PRO<sup>-</sup>, erano tutti provenienti dall'Asia sud-orientale e dal nord-Africa. E' opinione corrente che fra i ceppi prototrofi, la sensibilità alla penicillina è distribuita in modo eterogeneo [4,15], mentre gli auxotipi PRO<sup>-</sup> e ARG<sup>-</sup> sono tra i meno sensibili (i PRO<sup>-</sup> sono i più resistenti); al contrario gli AHU<sup>-</sup> (ARG, HYX, URA<sup>-</sup>) sono considerati i più sensibili alla penicillina [4,10,12].

Nel nostro studio la sensibilità dei ceppi prototrofi alla penicillina è distribuita secondo una curva gaussiana con acme corrispondente alla MIC di 0,25  $\mu$ g/ml e minimi alle MIC di 0,01 e 4  $\mu$ g/ml (Fig. 1).

Tale distribuzione è la risultante di uno spostamento negli ultimi 15 anni della sensibilità dei ceppi isolati nella nostra città. Nel 1968 infatti [16], il 57,4% dei ceppi era compreso nel gruppo a sensibilità massima; oggi tale gruppo rappresenta solo il 14% del totale dei ceppi prototrofi, mentre il 39% ha una sensibilità minore, corrispondente ad una MIC di 0,25  $\mu$ g/ml. L'entità dei ceppi totalmente resistenti all'antibiotico è rimasta praticamente immutata.

Diverso è il discorso riguardante i ceppi auxotrofi dei gruppi PRO<sup>-</sup>, ARG<sup>-</sup> e loro combinazioni con altre caratteristiche difettive, che rappresentano il 21,5% dei ceppi isolati.

Il ritrovamento di uno di questi fenotipi è collega-

Tabella 3. — *Differenze geografiche degli auxotipi di N. gonorrhoeae*

Nazione, città, anno	Prototrofi	AUXOTIPO (%di tutti i ceppi studiati)				Altri
		-PRO	-ARG	-PRO,ARG	-ARG,HYX,URA	
USA, Milwaukee 1973 [1]	25,5	33,8	17,5	1,2	9,6	12,4
USA, Rechester 1974 [9]	27,0	24,0	7,0	—	—	42,0
USA, Seattle 1975 [7]	18,4	15,7	6,1	—	56,1	3,7
USA, Des Moines 1975 [7]	12,2	16,2	2,3	—	57,1	12,2
USA, Chicago 1975 [7]	21,7	23,1	13,8	—	32,4	9,0
USA, Denver 1978 [8]	28,5	34,6	8,1	—	22,4	6,4
USA, Boston 1978 [8]	38,0	34,0	20,0	—	8,0	0
USA, Miami 1978 [8]	40,7	34,6	12,2	—	10,2	2,3
USA, Lexington 1980 [12]	26,3	40,8	8,0	—	17,8	7,0
Filippine 1975 [7]	60,2	38,5	0	—	0	1,3
Canada, Hamilton 1979 [5]	14,0	10,6	—	—	—	—
Canada, Montreal 1980 [14]	33,0	16,0	4,0	—	44,0	3,0
Inghilterra, Bristol 1982 [4]	29,2	6,7	10,0	12,5	27,5	14,1
Svezia, Stoccolma 1975 [11]	15,7	12,5	1,9	—	40,1	29,6
Svezia, Stoccolma 1977 [6]	16,3	12,7	1,9	—	40,1	29,0
Francia, Strasburgo 1979 [10]	51,4	27,6	9,1	0,9	7,4	3,6
Italia, Roma 1984	68,0	10,0	0,5	2,5	0	19,0

PRO: prolina; ARG: arginina; HYX: ipoxantina; URA: uracile

to, nella grande maggioranza dei casi, al riscontro di una resistenza elevata alla penicillina [4, 10, 12], rilevabile anche nei nostri ceppi (Fig. 1).

Questi, seppure non in numero rilevante, sono presumibilmente espressione di una circolazione nella popolazione romana di ceppi provenienti da mutazioni genetiche che si accompagnano ad un aumento della resistenza alla penicillina. Tali mutazioni sono spesso di provenienza extra-europea (Asia sud-orientale, Africa del nord), come nel caso dei rari ceppi produttori di  $\beta$ -lattamasi da noi isolati, ma possono anche rappresentare dei fenomeni spontanei come quelli osservati in altri paesi, come l'Inghilterra e l'Olanda, dove lo *spreading* dei ceppi  $\beta$ -lattamasi produttori è divenuto un fenomeno endemico [17-19].

Pertanto il controllo auxonografico dei ceppi può rappresentare un metodo indispensabile per valutare costantemente la diffusione nella popolazione delle mutazioni genetiche dei ceppi meno sensibili alla penicillina.

Inoltre, tale metodo può essere utile nel distinguere ceppi isolati successivamente da uno stesso paziente ed essere, quindi, di notevole aiuto per stabilire se trattasi dello stesso ceppo non eradicato per inefficacia del trattamento (*relapse*) o di un ceppo nuovo (*reinfection*).

Ricevuto il 3 novembre 1984

Accettato il 27 dicembre 1984

#### BIBLIOGRAFIA

1. CATLIN, B.W. 1973. Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J. Infect. Dis.* **128**: 178-194.
2. CARIFO, K. & CATLIN, B.W. 1973. *Neisseria gonorrhoeae* auxotyping: differentiation of clinical isolates based on growth responses on chemically defined media. *Appl. Microbiol.* **26**: 223-230.
3. COPLEY, C.G., CHISWELL, C.P. & EGGLESTONE, S.I. 1983. *Neisseria gonorrhoeae*: stability of typing markers after natural transmission. *Br. J. Vener. Dis.* **59**: 237-241.
4. COPLEY, C.G. & EGGLESTONE, S.I. 1983. Auxotyping of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in the United Kingdom. *J. Med. Microbiol.* **16**: 295-302.
5. HENDRY, A.T. & STEWART, I.O. 1979. Auxanographic grouping and typing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can. J. Microbiol.* **25**: 512-521.
6. KALLINGS, C.O. & MOBERG, I. 1977. Epidemiology of gonorrhoea. In: *Gonorrhoea: epidemiology and pathogenesis*. F.A. Skinner, P.D. Walker & H. Smith (Eds). FEMS Symposium n. 2. pp. 3-15.
7. KNAPP, J.S. & HOLMES, K.K. 1975. Disseminated gonococcal infections caused by *Neisseria gonorrhoeae* with unique nutritional requirements. *J. Infect. Dis.* **132**: 204-208.
8. KNAPP, J.S., THORNSBERRY, C., SCHOOLNIK, G.A., WIESNER, P.J., HOLMES, K.K. & the Cooperative Study Group. 1978. Phenotypic and epidemiologic correlates of auxotype in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Infect. Dis.* **138**: 160-165.
9. LA SCOlea, L.J. Jr. & YOUNG, F.E. 1974. Development of a defined minimal medium for the growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Appl. Microbiol.* **28**: 70-76.
10. LE FAOU, A., GUY, I. & RIOU, J.Y. 1979. Auxotypes et sensibilité à 6 antibiotiques des souches de *Neisseria gonorrhoeae* isolées à Strasbourg en 1977-1978. *Ann. Dermatol. Vener.* (Paris) **106**: 267-272.
11. MOBERG, I. 1975. Auxotyping of gonococcal isolates. In: *Proceedings of the symposium on genital infections and their complications*. D. Danielsson, L. Juhlin & P.A. Mardh (Eds). Almquist and Wiksell International, Stockholm. pp. 271-273.
12. NOBLE, R.C. & MILLER, B.R. 1980. Auxotypes and antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in black and white patients. *Br. J. Vener. Dis.* **56**: 26-30.
13. CAPRILLI, F. & ORTALI, A.V. 1968. Diagnosi microbiologica di *Neisseria gonorrhoeae*. Tecniche di isolamento ed identificazione. *G. Ital. Dermatol.* **109**: 181-188.

14. TURGEON, P.L. & JOLIVET GRANGER, M. 1980. Auxotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from localized and disseminated infections in Montreal. *Can. Med. Assoc. J.* **123**: 381-386.
15. STEWART, I.O. & HENDRY, A.T. 1979. Association between the auxogroup of *Neisseria gonorrhoeae* and the minimal inhibitory concentration of penicillin. *Sex. Transmitt. Dis.* **6**: 247-252.
16. CAPRILLI, F. & VALENZANO, L. 1968. Considerazioni sulla sensibilità *in vitro* agli antibiotici di 293 ceppi di *Neisseria gonorrhoeae*. *Bool. Ist. Dermatol. S. Gallicano.* **5**: 47-56.
17. ANSINK-SHIPPER, M.C., HUIKESHOVEN, M.H., WOUDESTRA, R.K., van KLINGEREN, B., DE KONING, G.A.I., TIO, D., JANSEN SCHOONHOVEN, F. & COUTINHO, R.A. 1984. Epidemiology of PPNG infections in Amsterdam: analysis by auxanographic typing and plasmid characterisation. *Br. J. Vener. Dis.* **60**: 23-28.
18. ANSINK-SHIPPER, M.C., van KLINGEREN, B., HUIKESHOVEN, M.H., WOUDESTRA, R.K., DESSENS-KROON, M. & van WIJNGAARDEN, L.J. 1984. Epidemiology of PPNG infections in the Netherlands: analysis by auxanographic typing and plasmid identification. *Br. J. Vener. Dis.* **60**: 141-146.
19. Extract from the Annual Report of the Chief Medical Officer of the Department of Health and Social Security for the year 1981. 1983. Sexually transmitted diseases. *Br. J. Vener. Dis.* **59**: 206-210.

NOTE BREVI

FOCOLAIO EPIDEMICO DI EPATITE VIRALE DA VIRUS A  
A TRASMISSIONE INTERUMANA

A. MELE (a), P. PERSANTE (b), P. CAVALCANTI (c), A. CRISTIANI (d), C. CURIANO' (a) e D. GRECO (a)

(a) Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Laboratorio Provinciale di Igiene e Profilassi, Cosenza

(c) Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Annunziata, Cosenza

(d) Ufficio di Igiene, Scalea (Cosenza)

Riassunto. — Gli autori descrivono un'epidemia di epatite virale da virus A che si è verificata nel comune di Scalea dal dicembre 1983 al gennaio 1984. Diciassette soggetti hanno soddisfatto la definizione di caso. Le caratteristiche della curva epidemica suggeriscono un'epidemia da trasmissione persona a persona. E' stato ricostruito l'albero di trasmissione dell'infezione.

Summary (A person to person hepatitis A outbreak). — The authors report a hepatitis A outbreak which took place in Scalea from December 1983 to January 1984. Seventeen cases meet the definition. The epidemic curve suggests a person to person transmission of infection. A transmission tree of the infection was constructed.

Introduzione

L'epatite virale acuta (EVA) di tipo A è una delle malattie a trasmissione orofecale più diffuse in Italia. Un'indagine condotta su un gruppo di USL dell'Italia centrale e meridionale mostra che circa il 50% dei casi di epatite acuta notificati (circa 30.000 all'anno) sono da virus A [1,2]. Inoltre, studi sieroepidemiologici sulla prevalenza delle IgG anti-HAV nella popolazione apparentemente sana confermano l'alta circolazione di tale virus in particolare in alcune aree dell'Italia meridionale [3,4]. Tutto ciò rende poco frequente il verificarsi di episodi epidemici o limita molto le loro dimensioni. Tali episodi, ove si verificano, riguardano principalmente popolazioni infantili, per la più bassa copertura immunitaria che esse presentano, mentre, in aree dove miglioramenti più radicali delle condizioni igieniche hanno abbassato l'incidenza di tali malattie, questi possono interessare anche fasce più adulte della popolazione [5,6].

Il presente studio di una epidemia di epatite A, verificatasi a Scalea, è stato condotto al fine di chiarire le modalità di contagio.

Materiali e metodi

Dal novembre 1983 alla prima metà di gennaio 1984, all'autorità sanitaria di Scalea sono stati segnalati 20 casi di epatite virale acuta. Scalea è un paese della costa tirrenica della Calabria di circa 7.500 abitanti. Nei 10 anni precedenti furono segnalati soltanto 1-2 casi all'anno di EVA.

E' stato definito caso di EVA, il soggetto che presentava ittero ed elevazione delle transaminasi almeno due volte i valori normali. Per la definizione eziologica sono state eseguite con metodica RIA le IgM anti-HAV, l'HBsAg e le IgM anti-HBc.

Due epidemiologi hanno intervistato tutti i casi. E' stata utilizzata un'apposita scheda che oltre a riportare notizie anagrafiche e cliniche, si soffermava sui fattori di rischio delle epatiti (frutti di mare, latticini, dolci, pratiche iniettive, trasfusioni, ecc.) e su eventuali contatti con ammalati di epatite, avuti almeno 15 giorni prima dell'esordio della malattia. Quest'ultima informazione è stata utilizzata per ricostruire la probabile catena di contagio.

Risultati

Tutti i 20 soggetti notificati hanno soddisfatto la definizione di caso. Tre di essi, tutti soggetti adulti, la cui malattia era insorta clinicamente tra novembre e dicembre, sono risultati affetti da EVA di tipo B: un maschio di 20 anni era tossicodipendente, mentre per gli altri due casi non è stata individuata nessuna delle possibili cause di contagio. I rimanenti 17 casi, tutti HBsAg negativi, sono stati etichettati come EVA di tipo A; per 14 di questi, le IgM anti-HAV sono risultate positive, mentre per altri 3, familiari di due dei precedenti casi, non disponendo di questo dato sierologico, la diagnosi è stata presuntiva; inoltre, uno di questi 3 casi, una bambina di 10 anni, è deceduta per

EVA fulminante. L'età media di questi 17 soggetti, di cui 11 maschi e 6 femmine, è di 11 anni. La Tab. 1 mostra i tassi di attacco specifici per età nei nove nuclei familiari colpiti. La Fig. 1 mostra la curva epidemica: i casi si distribuiscono nell'arco di un mese senza nessun raggruppamento particolare.

Tabella 1. — Tassi di attacco di epatite virale acuta A nei nove nuclei familiari

Età	N. componenti delle famiglie	N. casi	Tasso %
0 - 5	4	2	50
6 - 10	11	5	45
11 - 15	14	10	71
16 +	27	0	0
Totale	56	17	33

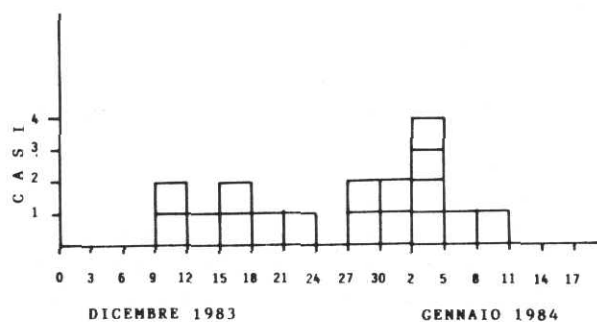


Fig. 1. — Andamento dei casi nel tempo (periodi di 3 giorni)

La storia alimentare, relativa ad un periodo variabile da 15 a 45 giorni precedenti l'esordio clinico della malattia nei 17 casi, non ha rilevato il consumo comune di alcun alimento incriminabile come fonte di contagio, mentre soltanto 2 casi, i primi che si erano manifestati, avevano consumato frutti di mare crudi.

L'eventualità di un inquinamento della rete idrica è stata esclusa, in quanto l'epidemia ha interessato soltanto una ristretta zona della città e non la circostante area servita dagli stessi rami dell'acquedotto.

La distribuzione dei casi all'interno della scuola non ha mostrato alcun raggruppamento particolare, mentre tutti, tranne i 3 casi iniziali, avevano avuto contatti frequenti extra scolastici con vicini di casa o familiari ammalatisi almeno 15 giorni prima.

La Fig. 2 mostra la ricostruzione della possibile catena di contagio: ognuno dei casi segnalati, tranne i primi tre, è legato con un altro caso.

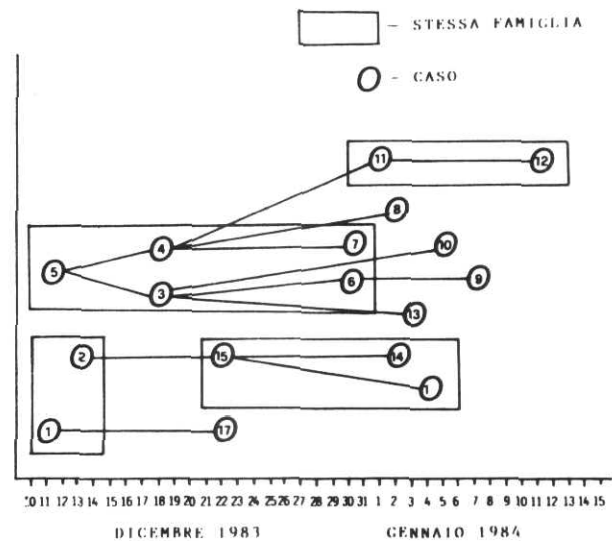


Fig. 2. — Catena di contagio dell'infezione

## Discussione

La distribuzione dei casi nell'arco di 30 giorni, l'esclusione di una fonte comune di contagio ed il contatto stretto e ripetuto che hanno avuto tra di loro i casi, depongono per un'epidemia da contagio persona a persona. Il consumo di frutti di mare crudi riscontrati nei primi due casi potrebbe suggerire una possibile fonte iniziale del contagio.

Il fatto che alcuni casi frequentavano la scuola elementare della città aveva fatto nascere l'ipotesi che la scuola avesse avuto un ruolo nell'epidemia. Tale eventualità però non è confermata perché gli 8 casi che frequentavano la scuola non mostravano alcun raggruppamento né per classe né per uso comune di servizi igienici o mensa.

Come evidenziato dalla Tab. 1, tutti i casi avevano un'età inferiore a 16 anni. Ciò richiama quanto detto nell'introduzione circa la maggiore copertura immunitaria negli adulti a cui va aggiunta anche la maggiore possibilità di contagio che si può realizzare nei bambini attraverso il gioco e, in quelli più piccoli, la non scrupolosa osservanza delle comuni norme igieniche.

Nel corso dell'epidemia, un caso è deceduto per EVA fulminante. Sfortunatamente non essendo disponibile il risultato delle IgM anti-HAV non è possibile una diagnosi di certezza, sebbene, essendo la bambina deceduta sorella di un caso per il quale esiste la conferma sierologica di epatite di tipo A, sia molto probabile che si tratti di infezione acuta da virus A. Tale infezione può provocare, come altri virus epatitici, epatite fulminante [7].

Ricevuto il 31 maggio 1984

Accettato il 21 dicembre 1984

## BIBLIOGRAFIA

1. Sistema epidemiologico integrato dell'epatite virale acuta (SEIEVA). 1984. *Boll. Epidemiol. Naz.* (50/51): 1-3.



2. Dati SEIEVA. 1984. *Boll. Epidemiol. Naz.* (50/51):2.
3. MELE, A. *et al.* 1983. Epatite virale acuta a Napoli. In: *Materiali per l'analisi e la programmazione socio-sanitaria*. Osservatorio epidemiologico, Comune di Napoli. Vol. 2, pp. 1-51.
4. LA ROSA, G., GIULI, V. & FERRANA, B. 1979. First results of anti-HAV antibodies assay in western Sicily. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* 58: 682-683.
5. Epidemia di epatite virale acuta di tipo A: Livorno. 1984. *Boll. Epidemiol. Naz.* (50-51): 4-6.
6. PORTERA, M., VITALE, F., ROMANO, N., LA ROSA, G., POLIZZI, M.C., CANE, R. & INTONAZZO, V. 1984. Sta cambiando l'epidemiologia dell'epatite virale di tipo A in Sicilia? Studio di un'epidemia di un'epatite virale acuta A a Caltanissetta. *Acta Medit. Patol. Inf. Trop.* 3: 333-343.
7. GIUSTI, G. *et al.* 1984. Le epatiti virali acute in Italia. Studio su 8.604 casi ricoverati nel 1982 in 53 reparti specialistici. *Acta Medit. Patol. Inf. Trop.* 3: 14-38.

## ISOLAMENTO DI *NEISSERIA MENINGITIDIS* DA MASCHI OMOSESSUALI

F. CAPRILLI, G. GENTILI, G. PALAMARA, G. PRIGNANO, E. CRESCIMBENI e M. BELARDI

Laboratorio di Microbiologia, Istituto Ospitaliero Dermosifilopatico di S. Maria e S. Gallicano, Roma

**Riassunto.** — Negli ultimi sei mesi sono stati sottoposti a indagini microbiologiche e sierologiche per le malattie sessualmente trasmesse 131 maschi omosessuali. Tra gli esami effettuati è stato costantemente eseguito un tampone faringeo per conoscere l'incidenza dei portatori faringei di *Neisseria meningitidis*. La stessa indagine è stata eseguita su 135 maschi affetti da uretrite gonococcica e 30 pazienti ricoverati per malattie dermatologiche. I risultati hanno dimostrato che la *N. meningitidis* era presente nel 26,7% dei campioni faringei degli omosessuali e solamente nell'11,8% dei campioni dei blenorragici e nel 10% di quelli dei ricoverati. Questi dati sono di particolare interesse, tenendo conto che in Italia i portatori faringei di *N. meningitidis* sono il 13% della popolazione sana. Tutti i ceppi di *N. meningitidis* isolati sono stati tipizzati in sierogruppi ed è stata studiata la loro sensibilità a 7 antibiotici e chemioterapici.

**Summary** (Isolation of *Neisseria meningitidis* from homosexual men). — During the last six months, 131 homosexual men were submitted to microbiological and serological examinations for the sexual transmitted diseases. The examinations always included a pharyngeal exudate specimen in order to evaluate the incidence of the pharyngeal carriers of *Neisseria meningitidis*. The investigation has been extended to 135 male outpatients with gonococcal urethritis and to 30 inpatients with dermatological diseases. The results showed that *N. meningitidis* was present in 26,7% of the pharyngeal specimens from the homosexual men and only in 11,8% of the specimens from the subjects with gonococcal urethritis and in 10% of the specimens from the inpatients. These data are of particular interest, considering that in Italy the pharyngeal carriers of *N. meningitidis* represent 13% of the healthy subjects. All the isolates of *N. meningitidis* have also been typed by serogroup analysis and studied for the sensitivity to 7 antibiotics and chemotherapeutics.

Negli ultimi anni sono stati segnalati nella zona di New York numerosi portatori faringei di *Neisseria meningitidis* fra gli omosessuali, con valori compresi tra il 42,5% e il 60-67% secondo gli autori [1,2]; tali percentuali sono notevolmente più elevate di quelle riscontrate alcuni anni prima nella popolazione sana della stessa area [3].

Allo scopo di verificare se questa situazione fosse presente anche a Roma abbiamo esaminato 131 maschi omosessuali, ad ognuno dei quali è stato praticato un tampone faringeo. L'isolamento è stato ottenuto su GC Medium BBL, addizionato con il 10% di siero normale di cavallo Sclavo, con l'1% di una miscela di aminoacidi e vitamine (IsoVitaleX Enrichment BBL) e reso selettivo con aggiunta di antibiotici (VCN Inhibitor BBL); le colonie sviluppatasi dopo 48 h di incubazione a 37 °C in *candle jar* sono state identificate con la prova dell'ossidasi e con il metodo della fermentazione degli zuccheri in CTA Medium BBL. Ogni ceppo di *N. meningitidis* isolato è stato sottoposto a tipizzazione sierologica mediante agglutinazione su vetrino con antisieri Wellcome Diagnostics.

Per ogni ceppo è stato allestito un antibiogramma nei riguardi di Penicillina, Cefotaxime, Ceftriaxone, Norfloxacin, Iosamicina, Spectinomycin e Co-trimossazolo, utilizzando il metodo della diffusione in agar degli antibiotici contenuti nei *Susceptibility Discs* della Oxoid con livelli standard di impregnazione, oppure in dischi preparati in laboratorio contenenti Spectinomycin con livelli di 10, 15, 30 mcg/ml. Per questa prova è stato utilizzato il Mueller Hinton Agar Oxoid, addizionato con il 10% di siero normale di cavallo Sclavo e con l'1% di IsoVitaleX Enrichment BBL. Le piastre sono state incubate in *candle jar* a 37 °C per 24 h. L'attività degli antibiotici è stata valutata in base ai diametri degli aloni di inibizione secondo le raccomandazioni del "National Committee for Clinical Laboratory Standards". Un'indagine parallela è stata iniziata su altri due gruppi di pazienti, il primo costituito da maschi etero-

Tabella 1. — Distribuzione dei sierogruppi di *Neisseria meningitidis* isolati da tamponi faringei di maschi omosessuali

	Gruppo							Non gruppabili	Totale
	A	B	C	W <sub>135</sub>	X	Y	Z		
N. ceppi	0	13	2	2	2	4	1	11	35
%	0	37,1	5,7	5,7	5,7	11,4	2,8	31,4	100

rosessuali affetti da uretrite acuta blenorragica e il secondo da pazienti ricoverati per malattie dermatologiche non sottoposti a terapie antibiotiche e/o immunosoppressive. La *Neisseria meningitidis* è stata isolata dai tamponi faringei di 35 dei 131 omosessuali esaminati (26,7%), di 16 dei 135 blenorragici (11,8%) e di 3 di un primo gruppo di 30 ricoverati (10%); studi su un più ampio numero di soggetti sono attualmente in corso.

In un'indagine svolta tra il 1976 e il 1977 in Italia [4] la percentuale di portatori faringei di *N. meningitidis* nella popolazione sana si aggirava tra il 10% e il 13%. Pertanto, pur ripromettendoci di verificare questi dati nel proseguo della ricerca, ci sembra di poter affermare che anche in Italia i portatori faringei di *N. meningitidis* sono molto più frequenti fra gli omosessuali rispetto ad altri gruppi di soggetti. La loro incidenza è inferiore a quanto osservato negli Stati Uniti [1,2], ma occorre rilevare che anche la percentuale di portatori nella popolazione sana dell'area di New York è maggiore della nostra [3].

E' noto che il gruppo A dei meningococchi è la causa principale della meningite cerebrospinale nei paesi dove frequenti sono le epidemie, ma che negli ultimi anni esso è stato soppiantato dai ceppi di gruppo B e C tra i militari e nelle comunità civili del Nord America. Tra i ceppi isolati dal faringe degli omosessuali da noi studiati quelli gruppabili sono la maggioranza, con predominanza del gruppo B (37% dei ceppi) e del gruppo Y (11,4%) (Tab. 1). E' da sottolineare l'elevata circolazione fra questi pazienti dei gruppi cosiddetti rari (W<sub>135</sub>, X, Z). I ceppi non gruppabili rappresentano quasi un terzo dei casi (31,4%). E' interessante notare che le percentuali dei vari gruppi sierologici da noi rilevati sono simili a quelle osservate in uno studio analogo condotto in Inghilterra [5], tra i cui ceppi prevale il gruppo B (40%), seguiti dai ceppi non gruppabili (36,5%).

Negli altri due gruppi da noi studiati i ceppi più frequenti appartengono ai non gruppabili (50% dei ceppi) e al gruppo B (25%); presenti anche fra questi ceppi i gruppi rari (W<sub>135</sub>, X, ma non il Z), in accordo con quanto già rilevato per la popolazione sana in Italia [4].

Le differenze riscontrabili fra i diversi gruppi di soggetti e fra le percentuali dei ceppi non gruppabili e gruppabili sierologicamente possono dipendere dai meccanismi di diffusione delle due categorie sierologiche della *N. meningitidis*.

Secondo una teoria recentemente formulata [5] i ceppi non gruppabili colonizzerebbero il faringe, veicolati dalle goccioline di Flügge; tutti gli individui sono perciò esposti in modo eguale alla diffusione di tali ceppi. I ceppi gruppabili colonizzano il faringe solo per contagio diretto con la saliva. Questa potrebbe essere la più probabile causa della percentuale elevata di portatori faringei di meningococchi gruppabili fra gli omosessuali, per i quali sono numerosi i contatti bocca a bocca con partners diversi. I frequenti cambiamenti del partner sembrano, infatti, aumentare le possibilità di acquisire i meningococchi nel faringe [6].

La sensibilità dei ceppi isolati alla penicillina risulta buona nel 93,6% dei casi; il 96,8% dei ceppi è sensibile a Cefotaxime e Ceftriaxone, mentre il 100% di essi è sensibile alla Norfloxacina. La Iosamicina è efficace sul 90,3% dei ceppi, la Spectinomicina sull'87,1% di essi.

Differente è la spettro di sensibilità per il Co-trimossazolo (Sulfametossazolo e Thrimethoprim): il 58,1% dei ceppi risulta resistente a questa associazione di farmaci antifolici e solo il 38,7% sensibile; il 3,2% dei ceppi è dotato di sensibilità intermedia.

Ricevuto il 29 ottobre 1984

Accettato il 21 dicembre 1984

#### BIBLIOGRAFIA

1. FAUR, C.F., WILSON, M.E. & MAY, P.S. 1981. Isolation of *N. meningitidis* from patients in a gonorrhoea screening program: a four year survey in New York City. *Am. J. Public Health* 71: 53-58.
2. JANDA, W.M., BOHNHOFF, M., MORELLO, J.A. & LERNER, S.A. 1980. Prevalence and site-patogen studies of *Neisseria meningitidis* and *N. gonorrhoeae* in homosexual men. *J. Am. Med. Assoc.* 244: 2060-2064.
3. GREENFIELD, S. & FELDMAN, H.A. 1967. Familial carriers and meningococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* 277: 497-502.

4. MASTRANTONIO, P., ZAMPIERI, A., OCCHIONERO, M. & LUZZI, I. 1979. Indagine epidemiologica per la ricerca dei portatori sani di meningococco. *G. Mal. Infett. Parassit.* 31: 8-20.
5. YOUNG, H., HARRIS, A.B., ROBERTSON, D.H.H. & FALLON, R.J. 1983. Anogenital gonorrhoea and pharyngeal colonisation with meningococci: a serogroup analysis. *J. Infection* 6: 49-54.
6. YOUNG, H., HARRIS, A.B. & ROBERTSON, D.H.H. 1979. Individual susceptibility to neisserial infection? *Br. J. Vener. Dis.* 55: 188-190.