SIMPOSIO

ASPETTI CLINICI E DIAGNOSTICI DEI NUOVI PATOGENI INTESTINALI
CLINICAL AND DIAGNOSTIC ASPECTS OF NEW INTESTINAL PATHOGENS

Chairmen:

A. LJUNGH – Central Microbiological Laboratory, Stockholm, Sweden

F. SORICE – Istituto Malattie Infettive, Università degli Studi “La Sapienza”, Roma, Italia

OSSERVAZIONI EPIDEMIOLOGICHE SU 337 CASI DI DIARREA ACUTA IN ETA' INFANTILE

M. Fontana (a), G. Zuin (a), S. Paccagnini (a), P. Ferrante (b), G. Gandini (c)
& N. Principi (a)

(a) Clinica Pediatrica IV, (b) Istituto di Virologia, Università degli Studi,
Milano;

(c) Laboratorio Analisi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano, Italia

Riassunto. - Sono stati studiati 337 bambini con diarrea acuta osservati in 2 anni (79% ambulatoriali). Nel 44% dei casi è stata dimostrata una eziologia infettiva. Alcuni elementi clinici (vomito, sangue macroscopico nelle feci) ed alcuni semplici esami (ricerca di leucociti e di sostanze riducenti) possono essere di aiuto nell'indirizzare la diagnosi eziologica. La diarrea è stata di breve durata, la reidratazione orale è stata soddisfacente nella gran parte dei pazienti e la reintroduzione precoce del latte è stata per lo più ben tollerata.

Summary (Epidemiologic observations on 337 cases of acute diarrhoea in paediatric age). - We studied 337 children affected by acute diarrhoea during two years. We found an infectious agent in 44% of cases. Some clinical data (vomiting, macroscopic blood in faeces) and some test (search for leucocytes and reducing substances in faeces) are helpful for the aetiological diagnosis. The diarrhoea lasted few days, the oral rehydration was satisfactory in most patients and the rapid reintroduction of milk well tolerated.

Introduzione

La diarrea acuta infantile è, nei paesi industrializzati, patologia a decorso per lo più benigno che non richiede, nella maggioranza dei casi, altro provvedimento al di fuori della terapia reidratante. In casi particolari (piccoli lattanti, frequenza di comunità) la conoscenza dell'agente eziologico può avere rilevanza per l'instaurazione precoce di provvedimenti terapeutici e/o igienico-sanitari. Le conoscenze epidemiologiche in tema di diarrea acuta infantile si sono modificate negli ultimi anni, dapprima con l'identificazione del ruolo del rotavirus, e successivamente quello di patogeni relativamente "nuovi" quali *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas hydrophila* (1). Sono tuttavia pochi gli studi italiani a tale riguardo che siano stati condotti per periodi di tempo sufficientemente lunghi in popolazioni omogenee. Scopo di questo lavoro è fornire un contributo alla conoscenza della epidemiologia dei principali agenti di diarrea acuta nell'infanzia ed inoltre di descrivere alcune caratteristiche cliniche ed alcuni semplici rilievi strumentali che possono indirizzare, almeno in via presuntiva, la diagnosi eziologica.

Materiali e Metodi

Per due periodi di 12 mesi (ottobre 82 - settembre 83 e aprile 84 - marzo 85) sono stati studiati tutti i bambini giunti alla osservazione per diarrea

acuta presso la Clinica Pediatrica IV dell'Università di Milano, che ha sede in un Ospedale dell'hinterland milanese. Sono stati così indagati $157 + 180 = 337$ bambini, di cui il 79% ambulatoriali; i pazienti del secondo periodo sono stati indagati nell'ambito di uno studio policentrico organizzato dal Gruppo di Gastroenterologia della Società Italiana di Pediatria. Per ogni paziente sono stati raccolti alcuni dati anamnestici (febbre superiore a 38°C , oltre 3 episodi di vomito, presenza di muco e di sangue macroscopico nelle feci). Le feci sono state studiate per ricercare la presenza di Salmonella e Shigella (agar MacConkey, agar Hektoen, brodo Selenite), Campylobacter fetus spp. jejuni (secondo Blazer-Wang), Yersinia enterocolitica (agar C.I.N.). Nei 180 pazienti del secondo periodo è stata pure ricercata la presenza di Aeromonas hydrophila (agar sangue + ampicillina), quella di tossina LT di E.coli (Biken test, Virion Diagnostic Laboratories), di Giardia L. (osservazione a fresco di feci diarroiche); ogni decimo paziente di questo secondo periodo è stato pure indagato per la presenza di C.albicans (agar Sabouraud) e di S.aureus (Mannitol Salt agar). Sulle feci di 227 pazienti, appartenenti ad entrambi i periodi, è stata ricercata la presenza di rotavirus (Rotazyme, Abbott Laboratories). Infine, è stata ricercata la presenza di leucociti (blu di metilene ed eosina), di sostanze riducenti (Clinitest), di sangue occulto (Hemocult) ed è stato determinato il pH, l'osmolalità, le concentrazioni di Na e K. Ogni paziente è stato trattato con terapia reidratante (99,4% per os e 0,6% e.v.) e sospensione della alimentazione; essa è stata ripresa entro 24 h dall'osservazione ed il latte è stato reintrodotta entro la 48^a h. Per l'analisi statistica sono stati impiegati il test del chi-quadrato corretto per la continuità, il test "t" di Student e l'analisi della varianza di Kruskal Wallis.

Risultati

La Tabella 1 riporta le frequenze relative delle diagnosi eziologiche. La ricerca di A.hydrophila, C.albicans, S.aureus, Shigella e della tossina LT di E.coli ha sempre dato esito negativo. Essendo impossibile attribuire con certezza la eziologia nei casi in cui è stato isolato più di un patogeno, nella ulteriore esposizione vengono considerati unicamente i pazienti in cui è stato isolato un solo agente: Salmonella (SAL), Campylobacter (CAM) oppure rotavirus (ROTA), ed inoltre quelli in cui sia l'esame colturale che la ricerca del rotavirus ha dato esito negativo (NEG). La Tabella 2 riporta la frequenza relativa, mese per mese, osservata per i tre patogeni principali.

Tabella 1. - Eziologia attribuita

Eziologia	Frequenza (%)
Salmonella	7,1
Campylobacter	11,3
Salmonella + Campylobacter	0,3
Yersinia	0,9
Rotavirus	18,9
Rotavirus + Salmonella	3,8
Rotavirus + Campylobacter	1,4
(Tot. Rotavirus)	24,1
Giardia Lamblia	0,5
Diarrea "parenterale"	4,5
Non determinata	51,5
Totale	100

Tabella 2. - Distribuzione stagionale

Mese	N. Casi	(%)	SAL	CAM	ROTA
Gen	27		7,4	0	45
Feb	21		0	4,8	45,5
Mar	29		6,9	10,3	11,1
Apr	27		3,7	3,7	25
Mag	30		10	23,3	15,8
Giu	26		7,7	19,2	5,9
Lug	27		0	25,9	15,8
Ago	24		4,2	16,7	23,1
Set	41		9,8	12,2	12,1
Ott	41		14,6	7,3	11,1
Nov	21		4,8	4,8	14,3
Dic	23		8,7	4,3	21,1

Tabella 3. - Età (media $\pm$ d.s.) e frequenza di alcuni elementi clinici.

(* p < 0,05 vs gruppo ROTA § p < 0,05 vs gruppo NEG)

	Età (mesi)	Febbre	Vomito	Muco	S.Macrosc.
ROTA	24,3 $\pm$ 23,4	65,1 §	58,1 §	41,9	0
SAL	36,3 $\pm$ 39,1	79,2 §	29,2 *	66,7	50,0 §
CAM	36,9 $\pm$ 29,9	78,9 §	21,0 *	60,5	34,2 §
NEG	31,2 $\pm$ 32,7	34,9	33,1	55,8	10,1

Tabella 4. - Frequenza (%) di reperti positivi e media $\pm$ d.s. di osmolalità e anion gap. (* p < 0,05 vs ROTA § p < 0,05 vs NEG)

	S.occulto	Leucociti	Sost.Rid.	Osmolalità	Anion Gap
ROTA	63,1	8,1	19,0	450,4 $\pm$ 129,0	254,8 $\pm$ 23,0
SAL	70,0	55,0 *§	5,3	390,8 $\pm$ 79,7	170,7 $\pm$ 93,4 *§
CAM	58,8	28,6 §	4,2	395,1 $\pm$ 104,1	194,0 $\pm$ 119,4
NEG	38,3	10,2	7,7	448,1 $\pm$ 129,0	235,0 $\pm$ 124,3

Tabella 5. - Durata della diarrea e frequenza di recidiva alla reintroduzione del latte (*§ come Tabella 3 e 4)

	Durata (gg)	Recidiva
ROTA	3,03 $\pm$ 1,80	13,9 §
SAL	5,17 $\pm$ 2,14 *§	4,2
CAM	3,26 $\pm$ 1,63	2,6
NEG	3,92 $\pm$ 2,61	1,5

Le Tabelle 3 e 4 riportano, rispettivamente, i caratteri clinici e di laboratorio rilevati nei quattro gruppi citati, mentre la Tabella 5 riporta alcuni elementi relativi al decorso clinico.

LA NOSTRA ESPERIENZA IN TEMA DI INFEZIONI ENTERICHE DA CAMPYLOBACTER TERMOTOLLERANTI E YERSINIA ENTEROCOLITICA

S. Pauluzzi, M. Florio, M.V. Moretti & G. Stagni

Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi, Perugia, Italia

Riassunto. - Da 375 soggetti affetti da enterite acuta sono stati isolati 17 ceppi di Campylobacter termotolleranti (4,5%), 44 salmonelle (11,7%) e 2 Yersinia enterocolitica (0,5%). Inoltre per le due specie batteriche è stata valutata la sensibilità verso 12 antibiotici.

Summary (Our experience about intestinal infections with thermophilic Campylobacter and Yersinia enterocolitica). - The authors tested 375 subjects affected by acute enteritis and isolated 17 thermophilic Campylobacter (4,5%), 44 Salmonella (11,7%) and 2 Yersinia enterocolitica strains. The sensibility against 12 antimicrobial agents were valued.

Introduzione

Il Campylobacter e la Yersinia enterocolitica sono due patogeni emergenti come causa di enteriti acute (1, 2), abbiamo quindi voluto indagare la presenza in Umbria di questi due patogeni oltre alla loro sensibilità verso 12 antibiotici, questo perché sia il Campylobacter che la Yersinia enterocolitica possono causare infezioni gravi come meningiti, endocarditi, ecc., che richiedono un trattamento antibiotico mirato (2).

Materiali e Metodi

Sono stati esaminati 533 campioni di feci dal 1.6.84 al 30.9.85, 375 provenienti da soggetti con enterite e 158 da casi controllo. Il Campylobacter è stato isolato su piastre Campy-BAP della ditta BD e la Yersinia su agar S-S più il 20% di desossicolato di sodio dopo arricchimento a freddo (2, 3). La sensibilità agli antibiotici è stata valutata con il micrometodo su piastra in brodo Mueller-Hinton.

Risultati

Sono stati isolati 17 ceppi di Campylobacter termotolleranti (4,5%), 44 di Salmonella (11,7%), 2 di Yersinia enterocolitica (0,5%) e nessuna Shigella; nessun isolamento si è avuto dai casi controllo. La maggiore incidenza è stata rilevata per il Campylobacter tra i bambini da 1 a 5 anni (12,5%) (4), mentre nei giovani adulti l'incidenza è stata notevolmente inferiore (2,5%). La sensibilità agli antibiotici è sintetizzata nelle Tabelle 1 e 2 (5-8).

Tabella 1. - Percentuali di resistenza e tolleranza di 16 ceppi di Campylobacter termophilus

Antibiotico	MIC	MIC	Tolleranza
	10 ⁴ CFU	10 ⁸ CFU	10 ⁴ CFU
Ampicillina	Ø	Ø	Ø
Piperacillina	Ø	Ø	Ø
Cefotaxime	Ø	Ø	Ø
Ceftazidime	12,5	18,8	31,3
Aztreonam	18,8	31,3	6,25
Gentamicina	Ø	Ø	Ø
Amikacina	Ø	Ø	Ø
Cotrimoxazolo	Ø	6,25	Ø
Rifampicina	6,25	43,8	18,8
Tetraciclina	Ø	25,0	25,0
Eritromicina	Ø	Ø	Ø
Ciprofloxacina	Ø	62,5	31,3

Tabella 2. - Percentuali di resistenza e tolleranza di 16 ceppi di Yersinia enterocolitica

Antibiotico	MIC	MIC	Tolleranza
	10 ⁴ CFU	10 ⁸ CFU	10 ⁴ CFU
Ampicillina	Ø	100,0	Ø
Piperacillina	Ø	87,5	Ø
Cefotaxime	Ø	6,25	Ø
Ceftazidime	Ø	93,8	31,3
Aztreonam	25,0	100,0	Ø
Gentamicina	Ø	Ø	Ø
Amikacina	Ø	Ø	Ø
Rifampicina	100,0	100,0	--
Tetraciclina	Ø	6,25	18,8
Eritromicina	100,0	100,0	--
Norfloxacina	Ø	Ø	6,25
Ciprofloxacina	Ø	37,5	Ø
Tienamicina	Ø	Ø	Ø

Discussione

La presenza ubiquitaria del *Campylobacter* e il suo isolamento in percentuale uguale se non superiore alle *Salmonelle* nell'età infantile, rende necessaria la sua ricerca in maniera routinaria.

Lo studio della sensibilità agli antibiotici a basso e ad alto inoculo è indispensabile per valutare la loro efficacia anche in quelle condizioni come endocarditi, meningiti e sepsi, dove si raggiungono cariche batteriche elevate ed in cui è necessaria una attività sicuramente battericida.

BIBLIOGRAFIA

1. BUTZLER, J.P. & SKIRROW, M.B. 1979. Campylobacter enteritis. Clin. Gastroenterol. 8: 737-765.
2. RYSER, J.R. & HORNICK, B.R. 1980. A review of "new" bacterial strains causing diarrhea. In: Current Clinical Topics in Infectious Diseases. J.S. Remington & M.N. Swartz. Mc Graw-Hill Book Company (Eds). New York pp. 184-199.
3. WAUTERS, G. 1973. Improved methods for the isolation and the recognition of Yersinia enterocolitica. Contr. Microb. Immunol. 2: 68-70.
4. BOKKENHEUSER, V.D., RICHARDSON, N.J., BRYNER, J.H., ROUX, D.J., SCHUTTE, A.B., KOORNHOF, H.J., FREIMAN, I. & HARTMAN E. 1979. Detection of Enteric Campylobacteriosis in children. J. Clin. Microbiol. 9: 227-232.
5. VAANOOF, R., GORDTS, B., DIERICKX, R., COIGNAU, H. & BUTZLER, J.P. 1980. Bacteriostatic and bacteriocidal activities of 24 antimicrobial agents against Campylobacter fetus subsp. jejuni. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 118-121.
6. MICHEL, J., ROGOL, M. & DICKMAN, D. 1983. Susceptibility of clinical isolates of Campylobacter jejuni to sixteen antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 23: 796-797.
7. MONNO, R., MARCUCCIO, L. & BRANDONISIO, O. 1981. Yersinia enterocolitica: Rassegna sintetica-critica. Giorn. Batt. Virol. Immun. 74: 120-144.
8. RAEVUORI, M., HARVEY, S.M., PICKETT, M.J. & MARTIN, W.J. 1978. Yersinia enterocolitica: In vitro antimicrobial susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 888-890.

AEROMONAS E GASTROENTERITI NELL'INFANZIA

N. Figura (a), C. Ceccherini (a), L. Marri (b), S. Verdiani (a)
& A. Barberi (a)

(a) Istituto di Malattie Infettive; (b) Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Siena, Italia

Riassunto. - Ceppi di *Aeromonas* sono stati isolati dalle feci di 21 bambini su 561 (3,7%) affetti da enteriti e da 12 su 576 (2,1%) controlli. Le percentuali di isolamento non sono statisticamente significative. Di 39 ceppi di *Aeromonas* isolati (in alcuni casi dallo stesso campione di feci sono stati isolati ceppi di *Aeromonas* con differenti caratteristiche biochimiche) 6 erano *A. hydrophila*, 5 *A. sobria* e 26 *A. caviae*; due ceppi isolati da controlli erano saccarosio negativi e sono stati considerati appartenere ad un diverso gruppo di *Aeromonas*. Differenze significative non sono state trovate nella prevalenza di queste specie tra pazienti e controlli, né nella prevalenza di ceppi enterotossici e/o citotossici e/o produttori di emolisina tra pazienti e controlli.

Summary (*Aeromonas* and gastroenteritis in infants). - *Aeromonas* strains were isolated from feces of 21 of 561 (3,7%) children with enteritis and from 12 of 576 (2.1%) controls. The isolation rates are not statistically different. Out of 39 *Aeromonas* isolates (in some cases *aeromonas* with different biochemical characteristics were obtained from the same stool sample), six strains (five from patients) were *A. hydrophila*, five strains (three from patients) were *A. sobria* and 26 strains (18 from patients) were *A. caviae*; two strains from controls were sucrose-negative and considered as belonging to a different group of *Aeromonas*. No significant difference was found between the prevalence of these species from patients and that from controls, or between the prevalence of enterotoxin and/or cytotoxin and/or hemolysin producing strains in patients and in controls.

Introduzione

L'importanza degli *aeromonas* come patogeni intestinali è ancora dibattuta (1-4). La differenziazione in specie (in via di completamento) dei ceppi isolati potrà contribuire a risolvere il problema (5). Lo scopo di questo lavoro è di stabilire la prevalenza dei ceppi di *Aeromonas* in casi di enterite del bambino e in controlli, di differenziare i ceppi isolati a livello di specie e di verificarne la tossinogenicità.

Materiali e Metodi

Nel corso del 1984 sono state esaminate le feci di 561 bambini con enterite e di 576 controlli (bambini senza disturbi intestinali) per la presenza di *Aeromonas* e di altri agenti di enterite. Per l'isolamento degli *aeromonas* sono stati adoperati: agar DNasi con ampicillina (10 mg/l) e blu di toluidina, (0,005%), agar SS con il 2% di Na-desossicolato e agar xiloso-desossicolato-

citrato (seminato dopo arricchimento delle feci in acqua peptonata alcalinizzata). La differenziazione dei ceppi isolati è stata effettuata sulla base delle prove suggerite da Janda et al. (6) e Popoff e Véron (7). Dei ceppi isolati sono state determinate le attività emolitica, enterotossica (8) e citotossica (9).

Risultati

Ceppi di *Aeromonas* sono stati isolati da 21 pazienti (3,7%) (in cinque casi insieme ad altri patogeni) e 12 controlli (2,1%) (Tabella 1). Queste differenze non sono statisticamente significative. Le frequenze di identificazione degli altri agenti vengono riportate anch'esse nella Tabella 1.

Dei 39 ceppi isolati (alcuni campioni di feci contenevano *aeromonas* con caratteristiche biochimiche differenti) sei ceppi (cinque isolati da pazienti) erano *Aeromonas hydrophila*, cinque (tre da pazienti) *A. sobria* e 26 (18 da pazienti) *A. caviae*. Due ceppi isolati da controlli non fermentavano il saccarosio e sono stati considerati come gruppo distinto di *Aeromonas* (4). Nessuna specie è stata isolata significativamente più spesso da pazienti che da controlli.

I risultati delle prove di tossinogenicità vengono riportati nella Tabella 2: non è stata trovata alcuna differenza significativa tra prevalenza di *Aeromonas* produttori di enterotossina e/o di citotossina e/o di emolisina da pazienti e da controlli.

Discussione

In conclusione, quando vengono isolati ceppi di *Aeromonas* dalle feci, per una migliore comprensione del significato clinico di questi batteri, è importante, a nostro avviso, differenziarli a livello di specie e determinarne il potenziale patogeno. Nella nostra indagine, ciò è servito a confermare l'indi-

Tabella 1. - Prevalenza (%) dei vari agenti ricercati

Agenti	Pazienti	Controlli
<i>Aeromonas</i>	3,7	2,1
<i>Salmonella</i>	10,7	0,2
<i>Shigella</i>	0,4	0
<i>Y. enterocolitica</i>	0,5	0,2
<i>Campylobacter</i>	8,4	0,7
Rotavirus	10,4	non ricercati

Tabella 2. - Produzione di tossine da parte dei 39 ceppi di *Aeromonas* isolati (tra parentesi il numero dei ceppi isolati dai controlli)

Specie	N. ceppi esaminati	N. ceppi produttori di		
		Enterotossina	Citotossina	Emolisina
<i>A. hydrophila</i>	6	2 (1)	4 (1)	4 (1)
<i>A. sobria</i>	5	4 (2)	5 (2)	3 (1)
<i>A. caviae</i>	26	0	(1)	0
Saccaroso-negativa	2	(1)	(1)	(1)

cazione iniziale che ceppi di Aeromonas non possano essere considerati potenziali patogeni intestinali per i bambini che vivono nel Senese.

BIBLIOGRAFIA

1. GRACEY, M., BURKE, V. & ROBINSON, J. 1982. Aeromonas-associated gastroenteritis. Lancet II: 1304-1306.
2. MILLERSHIP, S.E., CURNOW, S.R. & CHATTOPADHYAY, B. 1983. Fecal carriage rate of Aeromonas hydrophila. J. Clin. Pathol. 36: 920-923.
3. PITARANGSY, C., ECHEVERRIA, P., WHITMIRE, R., TIRAPAT, C., FORMAL, S., DAMMING, G.J. & TINGTALAPONG, M. 1982. Enteropathogenicity of Aeromonas hydrophila and Plesiomonas shigelloides: prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. Infect. Immun. 35: 666-673.
4. TURNBULL, P.C.B., LEE, J.V., MILIOTIS, M.D., VAN DE VALLE, S., KOORNHOF, J., JEFFERY, L. & BRYANT, T.N. 1984. Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of Aeromonas species. J. Clin. Microbiol. 19: 175-180.
5. POPOFF, M. 1984. Genus III, Aeromonas. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. N.R. Krieg & J.G. Holt (Eds). The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 545-548.
6. JANDA, J.M., REITANO, M. & BOTTONE, E.J. 1984. Biotyping of Aeromonas isolates as a correlate to delineating a species-associated disease spectrum. J. Clin. Microbiol. 19: 44-47.
7. POPOFF, M. & VERON, M. 1976. A taxonomy study of the Aeromonas hydrophila-Aeromonas punctata group. J. Gen. Microbiol. 94: 11-22.
8. BURKE, V., GRACEY, M., ROBINSON, J., PECK, D., BEAMAN, J. & BUNDELL, C. 1983. The microbiology of childhood gastroenteritis: Aeromonas species and other infective agents. J. Infect. Dis 148: 68-74.
9. CUMBERBATCH, N., GURWITH, M.J., LANGSTON, C., SACK, R.B. & BRUNTON, J.L. 1979. Cytotoxic enterotoxin produced by Aeromonas hydrophila: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. Infect. Immun. 23: 829-837.

RICERCHE SUI TREPONEMI INTESTINALI UMANI

G. Dettori, R. Grillo, G. Branca, A.M. Aglianò

Istituto di Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia "A. Gemelli",
Università Cattolica del S. Cuore, Roma, Italia

Riassunto. - Nel corso degli ultimi cinque anni (1981-1985), abbiamo isolato numerosi ceppi di treponemi dalle feci di pazienti con sintomatologia a carico dell'apparato intestinale. I treponemi isolati presentano 5 flagelli a ciascuna estremità. Essi sono debolmente β -emolitici e correlati biochimicamente, antigenicamente e geneticamente con i ceppi emolitici suini patogeni (T.hyodysenteriae) e non patogeni (T.innocens). I ceppi intestinali emolitici umani da noi isolati sono geneticamente differenti dai treponemi umani patogeni (T.pallidum) e non patogeni (T.phagedenis).

Summary (Studies on human intestinal treponemes). - Beginning from 1981 we have isolated several strains of β -hemolytic treponemes from patients affected by different gastrointestinal disturbances. By DNA-DNA hybridization studies, we have shown human intestinal treponemes are genetically correlated to pathogenic (T.hyodysenteriae) and non pathogenic (T.innocens) β -hemolytic treponemes of swine and different from human treponemes (T.pallidum and T.phagedenis). The high correlation among human and swine β -hemolytic intestinal treponemes was supported by biochemical, enzymatic, gaschromatographic and antigenic studies.

Introduzione

Nell'uomo, la possibile associazione tra la presenza di organismi spirali-formi e sintomi di diarrea fu riportata già nel 1884 da Escherich, nel corso di una serie di ricerche sul colera a Napoli (1).

Nel 1894, Sanarelli (2), nel descrivere la notevole frequenza di spirochete nell'intestino diarroico delle cavie ed una lunga serie di tentativi di isolamento, prospettava la possibilità che anche nell'intestino umano possano verificarsi condizioni per la moltiplicazione di tali microrganismi. Più recentemente, Harland e Lee (3) osservarono al microscopio elettronico una correlazione tra presenza di spirochete e disturbi intestinali ed introdussero il termine di "Spirochetosi intestinale".

Sempre al microscopio elettronico, fu riscontrata la presenza di spirochete nella mucosa dell'intestino crasso di soggetti apparentemente normali da Minio, Toniatti e Torsoli (4). Successivamente Gad e coll. (5), mediante indagini istopatologiche ed al microscopio a scansione, riportarono 4 casi di diarrea persistente con spirochetosi. Douglas e Crucio (6) hanno descritto come dovuti a spirochetosi intestinale, due casi di diarrea ed emorragia rettale. La sintomatologia scompariva dopo trattamento con metronidazolo.

Il significato eziologico delle spirochete nella patologia umana non appariva, però, chiaro, anche a causa della mancanza di isolamenti.

Isolamenti di treponemi dall'uomo sono stati ripetutamente riportati da noi dopo il 1981 (7-10) e da altri ricercatori (11-14).

Materiali e Metodi

Sono stati studiati i seguenti treponemi: a) dodici treponemi intestinali umani β -emolitici (ceppi: D60, D87, D93, D95, D104, D187, D542, D4298, D4998, HRM10, HRM11, HRM12); b) il ceppo P18A di T.hyodysenteriae, enteropatogeno per il maiale; il ceppo M1 di T.innocens, non patogeno per il maiale; T.pallidum (Nichols); T.phagedenis.

I treponemi, ottenuti da conigli infettati (T.pallidum) o dopo coltura in vitro in anaerobiosi (ceppi intestinali umani e suini, T.phagedenis), sono stati preparati per la microscopia elettronica, per l'analisi gascromatografica, antigenica e genetica, come descritto precedentemente (7-10).

Risultati

Morfologia - Al microscopio ottico tutti i ceppi intestinali umani isolati hanno un aspetto elicoidale e flessuoso; sono attivamente mobili, con attorcigliamenti lungo l'asse maggiore. Lo studio al microscopio elettronico dei ceppi isolati ha mostrato che le cellule, di circa 7 μm di lunghezza x 0,32 μm di diametro, hanno estremità appuntite e sono coperte da uno strato esterno regolare. Esse hanno 5 flagelli inseriti in una fila subterminale.

Caratteristiche colturali - In piastre di agar-sangue incubate in anaerobiosi, si ha la formazione di colonie debolmente beta-emolitiche.

Caratteri biochimici - Dei dodici ceppi umani saggiati, dieci non producono indolo, idrolizzano l'esculina, crescono in glicina (1%) ma non in bile (1%); sono catalasi e ossidasi negativi, producono NH_3 ; formano acidi da maltoso, tréaloso, lattoso, fruttosio, glucosio, cellobiosio, saccarosio, arabinoso; sono inositolo negativi.

Due ceppi (D93, D95) differiscono dai precedenti solamente perché producono indolo.

Le indagini gascromatografiche hanno dimostrato che tutti i ceppi producono acido acetico, acido n-butirrico, tracce di acidi propionico e lattico. Qualche ceppo (D95) produce anche acido isovalerico.

Relazioni genetiche - Mediante prove di ibridazione DNA-DNA, sono state studiate le correlazioni genetiche esistenti tra i treponemi intestinali umani e suini, T.phagedenis e T.pallidum.

I risultati conseguiti dimostrano che tutti i treponemi intestinali umani sono geneticamente correlati tra loro e con i ceppi suini (patogeno e non patogeno) di T.hyodysenteriae, mentre sono geneticamente distinti da T.phagedenis e da T.pallidum (10).

Indagini sierologiche - Le prove di immunofluorescenza indiretta e di cross-immunolettroforesi hanno mostrato una stretta correlazione antigenica tra i ceppi umani e tra questi ed i ceppi porcini patogeno e non patogeno di T.hyodysenteriae (8).

Discussione

A partire dal 1981, sono stati isolati, presso il nostro Istituto, numerosi treponemi dal tratto intestinale di pazienti affetti da manifestazioni morbose diverse.

Tutti i ceppi isolati hanno una lunghezza di circa 7 μm x 0,32 μm e presentano 5 flagelli a ciascuna estremità: un numero più piccolo di quello dei ceppi suini descritti (15). Sotto il profilo strutturale appaiono simili ai treponemi coltivati quasi contemporaneamente da Tompkins, e coll. (11) e Lambert e coll. (12), mentre differiscono da quelli successivamente descritti da Hovind-Hougen e coll. (14).

Tutti i ceppi da noi isolati sono debolmente B-emolitici.

Essi sono morfologicamente, biochimicamente, antigenicamente e genetica-

mente correlati tra loro e con i treponemi suini (patogeni e non patogeni) mentre sono distinti da altri treponemi umani (T.phagedenis, T.pallidum).

Ringraziamenti - Questo lavoro è stato fatto con il contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Progetto Finalizzato Controllo Malattie da Infezione, Contratto n. 84.020.40.52.

BIBLIOGRAFIA

1. ESCHERICH, T. 1884. Klinisch-Therapeutische Beobachtungen aus der Cholera-Epidemie in Neapel. Arztliche Intelligentia 33: 561-564.
2. SANARELLI, G. 1895. Les vibrions intestinaux. Ann. Inst. Pasteur. 129.
3. HARLAND, W.A. & LEE, F.D. 1967. Intestinal spirochaetosis. Br. Med. J. 3: 718-719.
4. MINIO, F., TONIETTI, G. & TORSOLI, A. 1973. Spontaneous spirochete infestation in the colonic mucosa of healthy men. Rend. Gastro Enterol. 5: 183-195.
5. GAD, A., WILLEN, R., FURUGARD, K., FORS, B. & HRADSKY, M. 1977. Intestinal spirochaetosis as a cause of longstanding diarrhoea. Uppsala J. Med. Sci. 82: 49-54.
6. DOUGLAS, J.G. & CRUCIOLI, V. 1981. Spirochaetosis a remediable cause of diarrhoea and rectal bleeding? Br. Med. J. 283: 1362.
7. SANNA, A., DETTORI, G., GRILLO, R., ROSSI, A. & CHIARENZA, D. 1982. Isolation and propagation of a strain of Treponema from the human digestive tract - Preliminary report. Ig. Mod. 77: 287-297.
8. GRILLO, R., BRANCA, G., AGLIANO¹, A.M. & DETTORI, G. 1985. Antigenic analysis of human intestinal treponemes, of T.hyodysenteriae and T.phagedenis by intermediate gel crossed immunoelectrophoresis. Ig. Mod. 84: 57-69.
9. DETTORI, G., GRILLO, R., BRANCA, G., PARISI, G. & SANNA, A. 1983. Los Treponemas Intestinales Umanos. Reunion Internacional sobre Infecciones Intestinales, Granada, Spain. Laboratorio 75: 615-627.
10. AGLIANO¹, A.M., DETTORI, G., BRANCA, G., GRILLO, R., MANZARI, V. & SANNA, A. 1983. Genetic relationship between human and swine Treponema. Ig. Mod. 80: 699-705.
11. TOMPKINS, D.S., WAUGH, M.A. & COOKE, E.M. 1981. Isolation of intestinal spirochaetes from homosexuals. J. Clin. Pathol. 34: 1385-1387.
12. LAMBERT, T. & GOURSOT, G. 1982. Diarrhee aigue avec hemocoltures et coprocoltures positives a Treponema. Med. Mal. Infect. 12: 276-278.
13. KAPLAN, L.R. & TAKEUCHI, A. 1979. Purulent rectal discharge associated with a non treponemal spirochete. JAMA 241: 52-53.
14. HOVIND-HOUGEN K., BIRCH-ANDERSEN, A., HENRIK-NIELSEN, R., ORHOLM, M., PEDERSEN, J.O., TEGLBJAERG, P.S. & THAYSEN, E.H. 1982. Intestinal spirochaetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete Brachyspira aalborgi gen. nov. sp. nov. J. Clin. Microbiol. 16: 1127-1136.
15. KINYON, J.M. & HARRIS, D.L. 1979. Treponema innocens, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of Treponema hyodysenteriae Harris et al. Int. J. Syst. Bacteriol. 29: 102-109.

PRIME SEGNALAZIONI DI CASI DI BOTULISMO INFANTILE IN ITALIA

P. Aureli (a), C.L. Hatheway (b), L. Fenicia (a) & A.M. Ferrini (a)

- (a) Laboratorio di Alimenti, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia;
(b) Botulism Laboratory, Centers for Infectious Diseases, Atlanta, Georgia, USA

Riassunto. - Vengono riportati i primi casi di botulismo infantile verificatisi in Italia che hanno coinvolto 2 bambine di 4 mesi. La sintomatologia è stata irritazione, sonnolenza, svogliatezza nel mangiare, alterazione del tono del pianto. Le analisi microbiologiche sulle feci e sul siero delle pazienti hanno confermato la diagnosi di botulismo infantile dimostrando la tossina botulinica di tipo E nelle feci e nel siero e la presenza di un Cl. butyricum produttore della tossina botulinica nelle feci.

Viene altresì riferito il caso, il primo in Italia, di una bambina di 8 mesi morta improvvisamente ed inaspettatamente, dai cui reperti necroscopici è stato isolato il Cl. botulinum tipo B.

Non è stato in nessun caso isolato il veicolo dell'infezione.

Summary (First cases of infantile botulism in Italy). - We describe the first cases of infant botulism in Italy involving two babies - four months old.

The symptom were irritation, lethargic, diminished suck, altered cry.

Microbiological assays on stools and serum of the patients confirm the diagnosis of infant botulism identifying botulinum toxin type E in stools and serum and a Cl. butyricum producing this toxin in stools.

Moreover we describe the case - the first in Italy - of a suddenly and inexpectedly death baby - 8 months old - from whose necropsy specimens a Cl. botulinum type B was isolated.

The infection vehicle was identified in no case.

Introduzione

Secondo recenti indicazioni sono più di 400 i casi di botulismo infantile fino ad oggi segnalati in varie parti del mondo negli ultimi 9 anni, da quando venne per la prima volta riconosciuta questa nuova entità clinica (1, 2). Oggi alla luce delle successive conferme sappiamo che per cause non ancora chiarite le spore botuliniche, pervenute nel tratto gastro-intestinale di alcuni bambini mediante veicoli diversi, non tutti identificati (3), possono germinare e causare, previa produzione in vivo della tossina, la sindrome neuroparalitica definita botulismo infantile.

Questa nuova entità clinica si affianca così alle altre forme di botulismo finora descritte e ad un'ipotetica forma di botulismo infettivo dell'adulto di cui si sospetta l'esistenza (4).

Fatta eccezione di pochi casi, uno in cui è stata implicata la tossina tipo F (5) e due nei quali è stata evidenziata quella Bf (6), tutti i casi di botulismo infantile segnalati sono legati alle tossine tipo A e B e mai prima d'ora, per quanto di nostra conoscenza, sono riportati casi correlati al tipo

E.

In questa comunicazione riferiamo i risultati delle indagini microbiologiche dei primi casi di botulismo infantile verificatisi in Italia nei quali è stato implicato il sierotipo E e di un caso di una bambina morta improvvisamente ed inaspettatamente dalla quale è stato isolato il Cl. botulinum tipo B.

Materiali e Metodi

Casi clinici. 1. caso: Giulia R., una bambina di 16 settimane, del peso di 3150 g alla nascita, alimentata con latte artificiale fino allo svezzamento, presenta un insolito stato di irritabilità, diminuzione dell'appetito 4-5 giorni prima del ricovero; segue costipazione con dolori addominali ed alterazione del tono del pianto, ipotonia muscolare generalizzata e dispnea. Viene ricoverata all'Ospedale Bambin Gesù di Roma dove viene diagnosticata una sospetta occlusione ileo-cecale con conseguente intervento chirurgico al termine del quale si riscontra insufficienza respiratoria e stato di coma. Le analisi routinarie del liquido cerebrospinale e del siero così come l'elettroencefalogramma e l'ecocranio non rivelano nulla di anormale.

2. caso: Chiara V., una bambina di 16 settimane, del peso di 3400 g alla nascita, alimentata al seno fino allo svezzamento, presenta il giorno prima del ricovero un'alterazione del tono del pianto, difficoltà di suzione, sonnolenza e ipotonia, mentre al ricovero presso l'Ospedale Bambin Gesù di Roma viene riscontrata midriasi non reagente, coma ed insufficienza respiratoria. Viene formulata la diagnosi di sospetto botulismo, confortata dall'elettromiografia. Viene inoltre registrato all'elettroencefalogramma uno stato di male convulsivo.

3. caso: Federica F., una bambina di 32 settimane, del peso di 2800 g alla nascita, alimentata con latte artificiale, presenta all'improvviso ipotonia muscolare generalizzata, difficoltà respiratoria, cianosi, per cui viene portata all'Ospedale Civile di Frascati dove arriva cadavere. L'esame anatomico-patologico evidenzia macchie di Tardieu a livello del timo, del pericardio e della pleura di entrambi i polmoni, una congestione passiva a livello dell'encefalo, fegato, pancreas e reni.

Esami microbiologici. Sono stati sottoposti ad esame colturale per la ricerca di clostridi produttori di tossina botulinica i campioni di feci dei primi due casi e del contenuto intestinale (colon) oltre a frammenti di fegato, milza dell'ultimo caso. La tossina botulinica è stata ricercata sia nelle feci di una di essa che nel siero delle prime due pazienti, mentre non è stato possibile eseguirla nel terzo caso per la scarsa quantità del materiale disponibile. Le metodologie microbiologiche impiegate sono state quelle descritte in un precedente lavoro (7).

Sono stati inoltre esaminati campioni di polvere e di terriccio. Infine sono stati ricercati nelle feci dei primi casi anche alcuni acidi biliari mediante tecniche cromatografiche (8).

Risultati e Discussione

Il primo campione di feci della paziente Giulia R., esaminato dopo 10 giorni dal ricovero, è risultato positivo per la tossina botulinica tipo E. Questo risultato è stato confermato da un secondo campione prelevato dopo 20 giorni dal ricovero, mentre nei campioni successivi, prelevati rispettivamente dopo 25 e 35 giorni dal ricovero, la tossina non è stata più evidenziata. Anche nelle feci della paziente Chiara V. è stata evidenziata la tossina botulinica tipo E a partire dal secondo giorno dal ricovero fino al 21° giorno di degenza. Nella fase acuta della malattia durante la quale si è riscontrato uno stato di male convulsivo, la tossina è risultata presente anche nel siero; questo dato rappresenta una delle pochissime segnalazioni (5 fino ad oggi) sulla presenza

della tossina nel sangue dei neonati. Sono state eseguite le titolazioni della tossina nel siero e nelle feci, come pure è stato determinato il quadro della flora microbica intestinale. L'isolamento del microrganismo nelle feci si è rivelato sin dall'inizio assai problematico, in quanto il criterio di adottare l'attività lipasica come marcatore selettivo per lo screening delle colonie sospette, permetteva di isolare solo colonie non tossigene. Per contro, alcune delle colonie lipasi negative, lecitinasi negative, producevano una tossina neuroparalitica letale per il topo, neutralizzata dall'antitossina monovalente del Cl. botulinum tipo E e non dai tipi monovalenti A, B, C, D, F, G.

Le caratteristiche biochimiche di questo microrganismo sono più simili a quelle del Cl. butyricum che a quelle del Cl. botulinum. Questo è il secondo isolamento di un microrganismo gelatinasi negativo da un caso di botulismo infantile in cui non è implicato un microrganismo con le caratteristiche dei quattro gruppi in cui si articola il Cl. botulinum.

Dai reperti necroscopici della bambina Federica F. esaminati, il colon è risultato contenere il Cl. botulinum tipo B. Questo è l'unico caso positivo dei 5 bambini, morti improvvisamente ed inaspettatamente, da noi esaminati.

Tutti i campioni analizzati nel tentativo di ritrovare il veicolo dell'infezione sono risultati negativi, compreso il miele per il quale è stata svolta una ampia indagine nel corso della quale sono stati esaminati più di 200 campioni. La fonte dell'infezione resta pertanto sconosciuta.

L'ipotesi che i sali biliari potessero inibire (9) la moltiplicazione del Cl. botulinum ci ha portato ad esaminare le feci delle due bambine colpite dal clostridio produttore di tossina botulinica tipo E dimostrando la presenza dell'acido desossicolico ma non del litocolico. Pur risultando di limitato valore nel caso di infezione da Cl. botulinum, la composizione in acidi biliari delle feci dei soggetti infettati da clostridi produttori di tossina botulinica merita di essere considerata.

BIBLIOGRAFIA

1. PICKETT, J., BERG B., CHAPLIN E. & BRUNSTETTER-SHAFFER, M. 1976. Syndrome of botulism in infancy: clinical and elettrophysiologic study. N. Engl. J. Med. 295: 770-772.
2. MIDURA, T.F. & ARNON, S.S. 1976. Infant botulism: identification of Cl. botulinum and its toxins in feces. Lancet 2: 934-936.
3. ARNON, S.S., MIDURA, T.F., DAMUS, K., WOOD, R.M. & CHIN, J. 1979 Honey and other environmental risk factors for infant botulism. J. Pediatr. 94: 331-336.
4. MORRIS, G.J. & HATHEWAY, C.L. 1980. Botulism in United States. 1979. J. Infect. Dis. 142: 302-305.
5. Centers for Disease Control. 1984. Infant botulism Massachusetts MMWR 33: 165-166.
6. HOFFMAN, R.E., PINCOMB, B.J., SKEELS, M.R. & BURKHART, M.J. 1982. Type F infant botulism. Am. J. Dis. Child. 136: 270-271.
7. AURELI, P., FENICIA, L. & FERRINI, A.M. 1984. First outbreak of botulism type E in Italy by home-canned tuna fish. Boll. Ist. Sieroter. Milan. 63: 553-556.
8. EVRARD, E. & JONSSSEN, G. 1968. Gas-liquid. chromatografic determination of human bile acids. J. Lipid Res. 9: 226-236.
9. HUHTANEN, C.M. 1979. Bile acid inhibition of Cl. botulinum. Appl. Environ. Microbiol. 38: 216-218.

RICERCA DIRETTA DI TOSSINE BATTERICHE NELLE FECI DI BAMBINI CON DIARREA
MEDIANTE SAGGI DI CITOTOSSICITA' IN COLTURE CELLULARI

I. Luzzi (a), A. Caprioli (b), G. Capano (c), E. Romoli (d) & R. Bisicchia (e)

- (a) Lab. di Batteriologia e Micologia Medica e (b) Lab. di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma;
- (c) Ist. di Pediatria, II Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi, Napoli;
- (d) Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Presidio Ospedaliero, USL dell'Orvietano, Orvieto;
- (e) Ospedale dei Bambini "Umberto I", Brescia, Italia

Riassunto. - Mediante un test di citotossicità su cellule in coltura, è stata dimostrata la presenza di citotossine batteriche in campioni fecali provenienti sia da bambini con diarrea acuta (30 positivi su 183 esaminati) che da controlli asintomatici (6 positivi su 89 esaminati). Una prima caratterizzazione delle citotossine individuate è stata ottenuta mediante saggi di neutralizzazione con antisieri specifici per le tossine prodotte da alcune specie di *Clostridium*.

Summary (Direct detection of bacterial toxins in stools from children with diarrhoea by a cytotoxicity assay in tissue culture). - A cell culture assay has been used to detect toxins directly in stools from sporadic cases of infantile diarrhoea. Cytotoxins were revealed in 30 out of 183 samples from children with diarrhoea and in six of 89 samples from asymptomatic controls. A preliminary characterization of the cytotoxins was obtained by neutralization tests with clostridial antitoxins.

Introduzione

La rilevazione diretta di citotossine nelle feci di pazienti affetti da diarrea è attualmente il metodo più rapido ed affidabile per la diagnosi dell'intossicazione alimentare da *Clostridium perfringens* (1) e delle sindromi intestinali associate a *Clostridium difficile* (2). Il metodo più utilizzato per la ricerca diretta delle citotossine è il saggio di citotossicità in colture di tessuto (1,2).

Lo scopo di questo lavoro è accertare il possibile ruolo di microrganismi produttori di citotossine nell'etiologia della diarrea acuta infantile, utilizzando il saggio in colture cellulari come metodo di indagine.

Materiali e Metodi

Sono stati studiati 272 bambini di età compresa tra 0 e 3 anni ricoverati in tre differenti ospedali pediatrici nel periodo 1984-85. Centottantatré bambini erano affetti da diarrea acuta, 89 non presentavano alcuna sintomatologia gastroenterica e costituivano il gruppo controllo. I campioni fecali sono stati diluiti 1:10 in PBS 0,01M, pH 7,4, e gli estratti fecali sono stati ottenuti centrifugando a 10,000 x g per 15' e filtrando il supernatante attra-

verso membrane da 0,45 μ m. Per il saggio di citotossicità sono state utilizzate 3 diverse linee cellulari (CHO, Vero, HEp-2) cresciute in monostrato in piastrine microtiter da 96 pozzetti ($5,10^3$ cellule per pozzetto).

Le piastrine venivano inoculate (0,02 ml per pozzetto) con diluizioni al raddoppio degli estratti fecali e osservate per la comparsa di effetti citopatici durante un periodo di 48 ore. Gli effetti citopatici riscontrati sono stati caratterizzati sulla base delle modificazioni morfologiche indotte sulle 3 linee cellulari e mediante test di neutralizzazione effettuati con antisieri specifici per la citotossina di C.difficile e l'enterotossina di C.perfringens e con un pool di antisieri contro le tossine prodotte dai clostridi della gangrena gassosa (C.novyi tipo A e B, C.septicum, C.chauvoei, C.perfringens tipo A,B,C,D,E).

Risultati

I risultati dei saggi di citotossicità sono riportati in Tabella 1. Trenta (16,4%) dei 183 campioni provenienti dai casi e 6 (6,7%) di quelli ottenuti dagli 89 controlli produssero effetti citopatici in almeno due delle tre linee cellulari utilizzate. Quindici campioni, 11 dai casi e quattro dai controlli, mostrarono il caratteristico effetto citopatico della tossina di C.difficile, con arrotondamento delle cellule riscontrabile in tutte e tre le linee utilizzate, e furono neutralizzati dall'antitossina specifica; da tutti questi campioni sono stati isolati ceppi tossigenici di C.difficile e solo in uno degli 11 campioni ottenuti dai casi di diarrea è stato identificato un altro patogeno enterico (rotavirus). Cinque degli 11 bambini avevano ricevuto terapia antibiotica prima della comparsa dei sintomi, mentre uno era stato sottoposto a vaccinazione antipoliomielitica. Cinque campioni, tutti da casi di diarrea, mostrarono effetti citopatici di tipo distruttivo sulle cellule Vero ed HEp-2. In due di essi, l'effetto citotossico fu neutralizzato dall'antisiero specifico per l'enterotossina di C.perfringens; negli altri tre, la neutralizzazione fu ottenuta con l'antisiero polivalente contro i clostridi della gangrena gassosa e, successivamente, con l'antisiero specifico per le tossine prodotte dal C.perfringens di tipo B. Da questi cinque campioni fecali non è stato possibile isolare ceppi di C.perfringens capaci di produrre in vitro citotossine né identificare altri patogeni enterici. I due bambini in cui era stata riscontrata nelle feci l'enterotossina non erano implicati in episodi epidemici di intossicazione alimentare, ma uno di essi aveva ricevuto in precedenza terapia antibiotica. Sedici estratti fecali, 14 ottenuti dai casi e due dai controlli, produssero effetti citopatici di vario genere su tutte e tre le linee cellulari utilizzate; questi effetti non furono neutralizzati dagli antisieri utilizzati nel test. In sette dei 14 campioni fecali ottenuti dai malati furono identificati patogeni enterici (Salmonella in quattro, rotavirus in due, Campylobacter jejuni in uno).

Discussione

Mediante l'uso di un saggio di citotossicità in colture cellulari, sono state identificate tossine batteriche nelle feci di bambini con diarrea acuta. La citotossina di C.difficile è stata identificata sia nelle feci di bambini con diarrea che in quelle di controlli sani. E' difficile assegnare con certezza un ruolo causale a questa tossina nei casi di diarrea infantile, in quanto la presenza di C.difficile e della sua citotossina nelle feci di bambini asintomatici è un evento non raro (3,4). D'altra parte, non è nemmeno possibile escludere un ruolo etiologico del microrganismo nei nostri pazienti, vista la mancanza di altri patogeni enterici e il precedente trattamento antibiotico a cui circa la metà di essi è stato sottoposto.

Le citotossine neutralizzate dai sieri anti C.perfringens sono state

Tabella 1.- Citotossicità degli estratti fecali in colture di tessuto

Origine	N.di campioni	campioni neutralizzati dal siero anti citotossina enterotossina tossine dei			campioni non neutralizzati (%)	Totale
		di <u>C.difficile</u> (%)	di <u>C.perfringens</u> (%)	Clostridi della gangre na gassosa (%)		
Bambini con diarrea	183	11(6,0)	2(1,1)	3(1,6)	14(7,6)	30(16,4)
Bambini asinto- matici	89	4(4,5)	--	--	2(2,2)	6 (6,7)

riscontrate solo in campioni fecali provenienti da bambini con diarrea. La neutralizzazione di tre estratti fecali da parte dell'antisiero monovalente contro le tossine prodotte dal C.perfringens di tipo B è un risultato sorprendente, in quanto le principali tossine prodotte da questo microrganismo dovrebbero essere neutralizzate anche da almeno uno degli antisieri contro gli altri tipi di C.perfringens (5). Questa mancanza di reazioni crociate fa supporre la presenza di un fattore tossico diverso dalle tossine di C.perfringens già descritte.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che la ricerca di tossine batteriche libere nelle feci potrebbe dare un importante contributo alle conoscenze sull'etiologia della diarrea acuta infantile. Un ulteriore sviluppo di questo approccio potrebbe essere costituito dall'identificazione dei microrganismi responsabili della produzione delle tossine che non sono state neutralizzate dagli antisieri utilizzati.

Questo lavoro è stato realizzato con il parziale contributo (Contratto n. 84.03102.52) del Progetto Finalizzato "Controllo delle malattie da infezione" del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

BIBLIOGRAFIA

1. GIUGLIANO, L.G., STRINGER, M.F. & DRASAR, B.S. 1983. Detection of Clostridium perfringens enterotoxin by tissue culture and double gel diffusion methods. J. Med. Microbiol. 16: 233-237.
2. CHANG, T.W., LAUERMANN, M. & BARTLETT, J.G. 1979. Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis. J. Infect. Dis. 140: 765-770.
3. THOMPSON, C.M., GILLIGAN, P.H., FISHER, M.C. & LONG, S.S. 1983. Clostridium difficile cytotoxin in a pediatric population. Am. J. Dis. Child. 137: 271-274.
4. TORRES, J.F., CEDILLO, R., SANCHEZ, J., DILLMAN, C., GIOMO, S. & MUNOZ, O. 1984. Prevalence of Clostridium difficile and its cytotoxin in infants in Mexico. J. Clin. Microbiol. 20: 274-275.
5. McDONEL, J.L. 1980. Clostridium perfringens toxins (type A,B,C,D,E). Pharmacol. Ther. 10: 617-655.

COAGGLUTINATION AND ELISA FOR DETECTION OF ENTEROTOXINS AND COLONIZATION FACTOR ANTIGENS IN ESCHERICHIA COLI AND SALMONELLA

Å. Ljungh (a), B. Rönnerberg (b), S.B. Baloda (b), Y.Y. Yuk (b) & T. Wadström (b)

(a) Central Microbiological Laboratory, Stockholm;

(b) Department of Veterinary Microbiology, Biomedicum, Uppsala, Sweden

Summary. - Coagglutination tests for the detection of Escherichia coli heat-labile (LT) enterotoxin, colonization factor antigens (CFA/I and CFA/II) and for the serogrouping of enteropathogenic E.coli (EPEC) have been developed, and an ELISA for the detection of E.coli heat-stable (ST_a) toxin. These tests have been used in epidemiological studies, and other virulence determinants like surface hydrophobicity production of Shigella and Shigella-like toxins, and binding to fibronectin have been studied on isolated diarrhoeal strains.

Riassunto (Coagglutinazione e ELISA per la rivelazione di enterotossine ed antigeni dei fattori di colonizzazione in E.coli e Salmonella). - Sono stati messi a punto saggi di coagglutinazione per la rilevazione dell'enterotossina di E.coli LT, per gli antigeni di colonizzazione (CFA/I e CFA/II) e per la sierotipizzazione di E.coli enteropatogeno (EPEC), ed ELISA per la rilevazione della tossina di E.coli ST. Questi saggi sono stati utilizzati in studi epidemiologici, inoltre altri determinanti di virulenza quali l'idrofobicità di superficie di tossine di Shigella e Shigella-like ed il legame con la fibronectina sono stati studiati su ceppi isolati in casi di diarrea.

Introduction

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) are a major cause of diarrhoeal disease in humans as well as calves and piglets throughout the world (1). Heat-labile (LT) enterotoxin can be detected by rabbit intestinal loop test and other in vivo assays and more recently in a variety of immunoassays (Table 1) (2-5). In vivo tests have long been the only generally accepted diagnostic method for the detection of heat-stable toxin causing fluid accumulation in the suckling mouse test (ST_a or ST_I), and fluid accumulation in porcine intestinal loops (ST_b or ST_{II}) of weaned pigs (6). With recent development in recombinant DNA technology as well as in immunoassays, alternative methods are now available for rapid detection of ETEC strains suitable for diagnostic human and veterinary medicine and food microbiology outside central public health laboratories (Table 2) (7-9).

Materials and Methods

Bacterial strains. EPEC strains (140) from 12 countries were obtained in a WHO project. Sixty-four Salmonella strains (S.enteritidis, S.dublin, S.paratyphi, S.typhimurium) were isolated in India, Kuwait and Sweden (10). ETEC and A.hydrophila were isolated in previous epidemiological studies (11, 12).

Table 1. - Biological and immunological test for detection of heat-labile (LT) enterotoxin in Escherichia coli

Bioassays:	Rabbit skin and intestinal loop tests Tissue culture assays (adrenal Y1, CHO, Vero cells)
Immunoassays I:	RIA, Passive haemolysis, GM ₁ -ELISA Immunodiffusion test (BIKEN ¹ test, recommended by WHO)
II:	Coagglutination test (capillary and 2 minute slide test) Particle immunoassay (latex agglutination)

Table 2. - Biological and immunological tests for detection of heat-stable (ST) enterotoxin in Escherichia coli

Bioassay:	Suckling mouse test (ST _a or ST _I) Intestinal loop test in weaned ^I pigs (ST _b or ST _{II})
Other assays:	DNA gene probe test (ST _a and ST _b) ELISA TEST (ST _a) RIA (ST _a)

Campylobacter jejuni strains were obtained from dr T.J. Trust, Victoria, Canada, and E.coli RDEC-1 strains from dr J.E. Peters, Brussels, Belgium. Standard conditions for growth of ETEC, EPEC, Salmonella and Aeromonas as well as serotyping and biotyping of strains were described elsewhere (5, 9-13).

Toxin assays. Standard procedures for skin and intestinal loop assays in rabbits and tissue culture tests (adrenal Y1 and Chinese hamster ovary cells, CHO) were described elsewhere (12). Shiga and Shiga-like (SL) toxins were detected in HeLa S3 and Vero cells after growth in proteose-peptone water (1%).

Colonization factor antigens. Heat-killed Staphylococcus aureus (Cowan 1) were coated with specific antisera to purified CFA/I and CFA/II, as well as with antisera to O-antigens of the enteropathogenic serogroups (14).

Surface hydrophobicity test. Cell surface hydrophobicity was determined with the salt aggregation test, SAT (15).

Fibronectin binding. Bacterial strains were grown on CFA agar at 33°C for 24 hrs and binding of fibronectin (¹²⁵I-fibronectin) determined (16).

Immunoassays. Heat- and formalin killed S.aureus cells were coated with a high titer anti-LT serum (5). Strains were grown on blood agar over night before testing. An ELISA test for detection of E.coli ST_a after growth in Casamino yeast extract was developed which detects 15 pg of ST_a (9).

Results

Enterotoxin tests. The LT-coa test was more rapid and simple than other immunoassays (Table 1) to detect ETEC strains in human as well as porcine stool cultures. The assay was recently evaluated in epidemiological studies in New Zealand (17) and GDR (18). The ST-ELISA was evaluated in a study of 110 porcine E.coli (19). None out of 64 strains of S.typhimurium, S.enteritidis, and S.dublin which were positive in rabbit intestinal loop and/or skin assays were positive in the LT-coa. None out of 14 enterotoxigenic A.hydrophila reacted with the LT-coa, and none of 10 C.jejuni strains.

Rapid identification of CFA/I and CFA/II ETEC strains and EPEC O-antigens. The coa-test for identification of colonization factor antigens was more rapid, sensitive and reagent-saving than conventional immunodiffusion. Commercial EPEC O-grouping sera could be diluted more than 100 times before use in the coa-test (14).

Determination of cell surface hydrophobicity. Systematic studies in our laboratories have shown that all fimbrial antigens of human and animal ETEC strains as well as various fimbrial antigens of uropathogenic *E.coli* (K88, K99, F41, 987p, CFA/I etc.) express high surface hydrophobicity in different assays (11, 15). We recently proposed that the SAT could be used for rapid screening of new fimbrial and non-fimbrial surface-exposed outer membrane proteins (OMP's) which may determine intestinal colonization with ETEC, EPEC and other enteropathogens (13). In the present study 42 out of 96 EPEC strains aggregated in ammonium sulfate ≤ 1.6 M, i.e. were positive in the SAT. Of these, 9 strains did not haemagglutinate any of 6 erythrocyte species tested, and may thus expose hitherto undetected putative colonization factors. The only intestinal pathogen so far tested not showing hydrophobic surface properties in SAT or hydrophobic interaction chromatography is *C.jejuni* (T.J. Trust & T. Wadström, unpublished).

Fibronectin binding of ETEC, EPEC and Salmonella strains. Results of present ongoing screening studies of various intestinal pathogens are presented in Table 3.

Shiga and Shiga-like toxins in EPEC and other intestinal pathogens. About 140 EPEC strains were screened for SL toxin production. Thirty-three of 73 strains (45.2%) were strong producers of SL toxin, 23/73 (31.5%) were defined as weak or moderate toxin producers in HeLa S3 and Vero cell tests, and 17 strains were negative. Porcine EPEC strains of serogroup O139 showed a high proportion of strong SL toxin producing strains (60/67, 89.5%). Six strains of 67 were defined as weak toxin producers and 1 strain was negative. Preliminary screening of *S.typhimurium*, *A.hydrophila* and *C.jejuni* indicate that these organisms rarely produce SL toxin.

Discussion

Recent epidemiological studies on ETEC in human stool and water specimens with LT and ST-specific DNA gene probes showed that filter hybridization is a method which permits screening of large numbers of samples, and that the technique is sensitive in comparison with conventional tissue culture assays for LT, and suckling mouse test for ST (7). However, a parallel development of new simple immunoassays such as (i) modification of classical ELISA test with short incubation time, simplified washing procedure etc., and (ii) particle immunoassays (PIA) offer advantages over DNA gene probe assays.

Most important advantages of PIA over both gene probe assays and conventional ELISA tests are that no equipment is required and greater stability of reagents permitting longer shelf lives and shipping also in tropical climates. It is well established that the enzymatic activity of a number of enzymes is stabilized upon immobilization to a solid surface. We have found that immobilizing both LT and CFA specific antibodies on heat- and formalin killed staphylococci increase the shelf life significantly (5, 14, 17, 18). This fact has not been emphasized despite the fact that coa tests have been developed to detect a number of intestinal as well as extraintestinal pathogens.

Svenungson and Lindberg reported ten times higher dilution of Salmonella LPS specific antisera for coa testing compared to conventional agglutination assays which is in good agreement with the higher sensitivity we find with EPEC as well as CFA specific antisera (14, 20) (Table 1). This makes coa tests and PIA reagent saving and economical. Furthermore, the test performance is simple and easy to teach also among less trained personnel. These immunoassays also permit quantitative studies which gene probe assays do not.

Table 3. - Per cent of Bacterial strains binding ^{125}I -fibronectin

Organism	> 50% binding	2-50% binding	<2% binding (non-binders)
<u>Salmonella</u> sp.	19	22	5
EPEC	4	4	6
<u>E.coli</u> , edema disease	4	8	5
RDEC-1	0	0	32
<u>A.hydrophila</u>	0	2	56

Since some ETEC strains isolated from young piglets with diarrhoea (porcine LT, LT_h) do not react in our LT-coa based on antibodies against human LT (LT_h) it seems likely that coa tests or other tests based on polyclonals

against other LT:s than LT_h must be used, or that monoclonal antibodies reacting with a preserved domain of the A or B subunit of cholera toxin or LT (or a pool of such monoclonals) may be used to develop new immunoassays for enterotoxigenic enteropathogens to permit detection of LT-like enterotoxins.

The sensitivity of the LT-coa is inferior to immunofluorescence for detection of *Salmonella* organisms, and for detection of LT by GM₁-ELISA or similar immunoassays (2). The sensitivity of the LT-coa can be increased, however, and preliminary studies suggest that killed staphylococcal cells are not optimal for particle immunoassays. Further development of PIA's can make it possible to diagnose ETEC or cholera within a few minutes on watery stool specimens. It seems likely that ST-ELISA tests can be used for direct detection of ST antigen in stools from humans, pigs and calves with diarrhoea (C. Gyles, B. Rönnerberg & T. Wadström, personal communication).

Interestingly, our studies showed that *S.typhimurium* and *S.enteritidis* isolated from young children, adults and food showing positive rabbit intestinal loop and/or rabbit skin tests were negative in LT-coa while other enterotoxigenic *Salmonella* strains were positive in LT-coa (S. Rahm, S. Baloda, S. Sharma, B.V. Vadhera & T. Wadström, unpublished). We have earlier shown that *Salmonella* strains produced cytotoxic enterotoxin(s) unrelated to cholera toxin and LT, and factor(s) toxic for CHO cells (10). Our results with LT-coa on *A.hydrophila* strains confirm that this organism often produces a heat-labile enterotoxin not closely related to LT and cholera toxin, while Sakazaki and coworkers recently reported on cholera toxin like enterotoxin in 4.5% of *Aeromonas* strains isolated in Japan (21).

Less than half of ETEC strains isolated in various epidemiological studies on pediatric as well as travellers' diarrhoea are generally reported to produce CFA/I or CFA/II surface antigens. Rowe and coworkers recently reported on new putative colonization factor antigens (CFA/III, etc) (22). We find the SAT and recent modifications of this test for cell surface hydrophobicity an appropriate tool for screening of new putative colonization factors among ETEC and other intestinal pathogens for the detection of antigens which seem likely to interact with amphiphilic molecules in the small bowel gut mucus layer (23).

^{125}I -CFA/II-like ETEC strains of serogroup O6 were recently found to bind ^{125}I -fibronectin and attach to fibroblasts exposing surface fibronectin (24), and a high number of *Salmonella* strains likewise bound fibronectin (16). This encourages us to explore binding of fibronectin in small bowel mucus released from villi as a possible new intestinal colonization mechanism.

Why develop immunoassays when gene probe assays can be more rapidly developed as soon as a virulence determinant like ST_b has been determined?

Recent reports on high and low levels of Shiga and SL toxin production in human EPEC strains illustrate the need for immunoassays. EPEC strains as well as

strains from patients with haemorrhagic colitis (O157/H7 etc) were commonly high toxin producers (25), while strains isolated from carriers and the environment, including the classical E.coli K12 strain are low level Shiga toxin producers (A. O'Brien, personal communication). A gene probe assay for Shiga toxin will not discriminate between high and low level toxin production (R.K. Holmes & A. O'Brien, personal communication) or discriminate strains which may harbour silent genes for SL toxins (W. Goebel, personal communication). Finally, the development of immunoassays also permit simple development of serological tests based on the same antigens (LT, ST, SL etc) to study the seroconversion in patients and discriminate carrier states in epidemiological studies and single patients. The high incidence of LT and ST genes in environmental E.coli isolates as well as in control patients without diarrhoea in developing countries with a high burden of neenteropathogens makes it even more difficult to interpret DNA gene probe results.

Acknowledgements. Parts of this study were supported by the Swedish Medical Research Council (16x-4723) and by a grant from WHO.

REFERENCES

1. ROWE, B. 1979. The role of Escherichia coli in gastroenteritis. Clin. Gastroenterol. 8: 625-644.
2. SVENNERHOLM, A.M. & HOLMGREN, J. 1978. Identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxins by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM₁-ELISA) procedure. Curr. Microbiol. 1: 19-23.
3. HONDA, T., ARITA, M., TAKEDA, Y. & MIWATANI, T. 1982. Further evaluation of the Biker test (modified Elek test) for detection of enterotoxigenic Escherichia coli producing heat-labile enterotoxin and application of the test to sampling of heat-stable enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 16: 60-62.
4. BRILL, B.M., WASILAUSKAS, B.L. & RICHARDSON, S.H. 1979. Adaptation of the staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 9: 49-55.
5. RONNBERG, B. & WADSTROM, T. 1983. Rapid detection by a coagglutination test of heat-labile enterotoxin in cell lysates from blood agar-grown Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 17: 1021-1025.
6. BURGESS, N.M., MULLAN, N.A. & NEWSOME, P.M. 1980. Heat stable enterotoxins from Escherichia coli P-16. Infect. Immun. 28: 1038-1040.
7. MOSELEY, S.L., ECHECERRIA, P., SERIWATANA, J., TIRAPAT, C., CHAICUMPA, W., SAKULDAIPEARA & FALKOW, S. 1982. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. J. Infect. Dis. 145: 863-869.
8. GIANNELLA, R.A., DRAKE, K.W. & LUTTRELL. 1981. Development of a radioimmunoassay for Escherichia coli heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 33:186-192.
9. RONNBERG, B., CARLSSON, J. & WADSTROM, T. 1984. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Escherichia coli heat-stable enterotoxin. FEMS Lett. 23: 275-279.
10. BALODA, S.B., KROWACEK, K. FARIS, A. & WADSTROM, T. 1983. Cytotoxic enterotoxin and cytotoxic factors produced by Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium. Toxicon 21: 785-796.
11. WADSTROM, T., FARIS, A., LINDAHL, M. & HJERTEN, S. 1984. Hydrophobic properties of pili. In: Attachment of organisms to the gut mucosa. E.C. Boedeker (Ed). CRC Press, Boca Raton. pp. 113-120.
12. LJUNGH, A., ENEROTH, P. & WADSTROM, T. 1982. Cytotoxic enterotoxin from Aeromonas hydrophila. Toxicon 20: 787-794.

13. WADSTROM, T., ADEGBOLA, R., BALODA, S.B., FARIS, A., HJERTEN, S., LINDAHL, M. & RONNBERG, B. 1984. Enterotoxigenic (ETEC) and enteropathogenic (EPEC) E.coli express surface proteins (colonization factors) of different relative surface hydrophobicity. Abstract XI Int. Cong. Trop. Med. Malaria. Calgary, 16-20 Sept. 1984. p. 161.
14. FARIS, A., LJUNGH, A. & WADSTROM, T. 1985. Rapid identification of colonization factor antigens (CFA/I and CFA/II) of enterotoxigenic E.coli (ETEC) and O-antigen of enteropathogenic E.coli (EPEC) by coagglutination test. Zbl. Bakt. Hyg. A 259: 477-484.
15. LJUNGH, A. & WADSTROM, T. 1982. Salt aggregation test for measuring cell surface hydrophobicity of urinary Escherichia coli. Eur. J. Clin. Microbiol. 1: 388-393.
16. BALODA, S.B., FARIS, A., FROMAN, G. & WADSTROM, T. 1985. Fibronectin binding to Salmonella strains. FEMS Microbiol. Lett. 28: 1-5.
17. BETTELHEIM, K.A., GRACEY, M. & WADSTROM, T. The use of the coagglutination test to determine wheather Australian and New Zealand isolates of Escherichia coli produce the heat-labile enterotoxin. Zbl. Bakt. Hyg. A, in press.
18. RONNBERG, B., SAMTLEBEN, S., STEINRUCK, H. & WADSTROM, T. A rapid slide-agglutination method for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. Zbl. Bakt. Hyg. A, in press.
19. RONNBERG, B., SODERLIND, O. & WADSTROM, T. 1985. Evaluation of a competitive enzymelinked immunosorbent assay for porcine Escherichia coli enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 22: 000-000.
20. SVENUNGSÖN, B. & LINDBERG, A.A. 1979. Diagnosis of Salmonella bacteria. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 87: 29-36.
21. SHIMADA, T., SAKAZAKI, R., HORIGOME, K., UESAKA, Y. & NIWANO, K. 1984. Production of cholera-like enterotoxin by Aeromonas hydrophila. Jap. J. Med. Sci. Biol. 37: 141-144.
22. THOMAS, L.V., CRAVIOTO, A., SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. 1982. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic Escherichia coli in humans. Infect. Immun. 35: 1119-1124.
23. SLOMIANY, B.L. & SLOMIANY, A. 1984. Lipids of mucous secretions of the alimentary tract. In: Attachment of organisms to the gut mucosa. E.C. Boedeker (Ed). CRC Press, Boca Raton. pp. II: 23-33.
24. FROMAN, G., SWITALSKI, L.M., FARIS, A., WADSTROM, T. & HOOK, M. 1984. Binding of Escherichia coli to fibronectin. J. Biol. Chem. 259: 14899-14905.
25. CANTEY, J.R. 1985. Shiga toxin - an expanding role in the pathogenesis of infectious diseases. J. Infect. Dis. 151: 766-771.

IL SISTEMA IMMUNOENZIMATICO NELLA RICERCA DELLA TOSSINA LT DI E.COLI E DELLE TOSSINE DI C.DIFFICILE

W. Magliani, M.G. Menozzi, P. Valcavi, P. Somenzi, R. Lecchini & C. Chezzi

Istituto di Microbiologia, Facoltà di Medicina, Università degli Studi, Parma, Italia

Riassunto. - Vengono descritti un sistema GM1-ELISA per la ricerca della tossina LT di E.coli, basato sull'impiego di anticorpi antitossina colerica, ed un sistema ELISA-C.difficile, che utilizza un'antitossina coniugata a fosfatasi alcalina. Entrambi i sistemi hanno dimostrato sensibilità ed affidabilità paragonabili a quelle osservate con i saggi su cellule Vero e WI 38, rispettivamente, sia nel caso di ceppi isolati e coltivati in terreno liquido, sia nel caso di ricerca diretta delle tossine in filtrati fecali.

Summary (Immunoenzymatic assay to detect E.coli LT and C.difficile toxins). - GM1-ELISA test for the detection of E.coli heat-labile (LT) enterotoxin, and an ELISA-C.difficile are reported. Both tests showed similar sensitivity and specificity in comparison with conventional tissue culture assays on Vero and WI 38 cells, respectively for strains grown in a liquid medium, and for toxins presence in faeces.

Introduzione

I saggi su colture cellulari, pur rappresentando i sistemi più utilizzati per la ricerca sia della tossina LT di E.coli che delle tossine di C.difficile, tuttavia presentano difficoltà di allestimento che di fatto ne hanno limitato la utilizzazione.

Con le indagini riportate si è cercato di mettere a punto e sperimentare due diversi saggi immunoenzimatici: uno, indiretto, per la ricerca della tossina LT, basato sull'utilizzazione del ganglioside GM1 e di antitossina colerica, l'altro, per la ricerca delle tossine di C.difficile, basato sull'uso di un'antitossina coniugata a fosfatasi alcalina.

Materiali e Metodi

GM1-ELISA. - Sono stati utilizzati tossina colerica purificata (Sigma), 10 ceppi di E.coli di riferimento, produttori e non di tossina LT (1), e stipiti isolati da 135 campioni di feci, provenienti da pazienti con enterite; per ogni campione, 10 colonie diverse di E.coli venivano prelevate ed utilizzate per allestire un'unica brodocoltura ("pool 10"). I ceppi di riferimento ed i 135 "pool 10" venivano inoculati in 20 ml di terreno di Mundell, addizionato di lincomicina (2), ed incubati a 37°C per 24 ore in agitatore. Dopo centrifugazione, i soprannatanti, filtrati, venivano utilizzati o conservati a -70°C.

Il sistema ELISA utilizzato prevede l'incubazione, in pozzetti di piastre microtiter (Flow) per una notte a 4°C, di 200 µl di ganglioside GM1 (Supelco)

diluito a 10 µg/ml in PBS. Dopo 3 lavaggi con PBS contenente 0,05% di Tween 20 (PBST), le piastre venivano utilizzate o conservate a -70°C. Nei pozzetti venivano quindi depositi, in successione ed in ragione di 200 µl, i filtrati delle brodoculture o la tossina colerica, l'antisiero, ottenuto immunizzando conigli con tossina colerica purificata (Sigma), e il coniugato, rappresentato da anticorpi di capra anti-Ig di coniglio legati a perossidasi (Nordic Immunology). Ognuno dei componenti è stato lasciato per un'ora a 37°C, effettuando lavaggi con PBST tra le varie fasi. Infine, veniva depositato il substrato dell'enzima e, dopo 30' a temperatura ambiente, veniva effettuata una lettura spettrofotometrica (Multiskan, Flow).

ELISA-C.difficile. - Sono stati utilizzati il filtrato di una brodocultura di C.difficile e l'antitossina corrispondente (Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute - VPI - Blacksburg, USA). L'antitossina è stata coniugata a fosfatasi alcalina secondo la metodologia suggerita da Voller et al. (3). Sono stati saggiati 71 campioni di feci, provenienti da pazienti a rischio e/o con sospetta colite pseudomembranosa, 46 ceppi di Clostridium sp., isolati da materiale fecale, e due ceppi di riferimento, uno di C.difficile, l'altro di C.sordellii (Department of Infectious Diseases, NEMC Hospital, Boston, USA). Brodoculture in Cooked Meat Broth (Oxoid) sono state allestite incubando i ceppi a 37°C per 5 giorni. Sia le brodoculture che sospensioni fecali al 10% in PBS sono state centrifugate, filtrate e saggiate immediatamente o conservate a -70°C.

Il sistema ELISA utilizzato prevede l'incubazione in pozzetti di piastre microtiter (Flow) per una notte a 4°C, di 200 µl di antitossina, diluita a 10 µg/ml in tampone carbonato (pH 9,6). Dopo 3 lavaggi con PBST, nei pozzetti venivano depositi i filtrati in esame, per una notte a 4°C, e, dopo ulteriori lavaggi, il coniugato, costituito dall'antitossina legata a fosfatasi alcalina. Infine, dopo un'ora a 37°C, veniva aggiunto il substrato dell'enzima e si procedeva alla lettura spettrofotometrica dopo 60' a temperatura ambiente.

Saggi su colture cellulari - Come sistemi di confronto sono stati impiegati i saggi su cellule Vero, descritti precedentemente (1), e su cellule WI 38, eseguiti secondo la metodologia consigliata dal VPI, rispettivamente.

Risultati

GMI-ELISA. - Il sistema messo a punto ha mostrato una sensibilità paragonabile a quella del saggio su cellule Vero; entrambi i sistemi, infatti, riescono a rilevare la presenza di tossina colerica fino a 1 µg/ml, sia in terreno di Mundell che in estratti fecali. Concordanza tra i due sistemi è stata osservata anche per i ceppi di riferimento (Tabella 1). Poiché nel caso dei ceppi isolati da campioni clinici, il saggio veniva effettuato utilizzando il "pool 10" è stata verificata la sensibilità del sistema in rapporto al numero di colonie produttrici di LT nell'ambito delle 10. Sono state pertanto preparate brodoculture con colonie di un ceppo produttore e di uno stipite non produttore di LT in numero variabile da 9+1 a 1+9; è stato così possibile dimostrare che il sistema riesce ad evidenziare la tossina LT prodotta anche da una sola delle colonie nell'ambito del "pool 10". I risultati relativi ai 135 "pool 10", successivamente saggiati, hanno confermato la concordanza tra il sistema ELISA e il saggio su cellule Vero, con 12 casi positivi e 123 negativi in entrambi.

ELISA-C.difficile. - Il sistema utilizzato ha mostrato una sensibilità paragonabile a quella riscontrata con il saggio su cellule WI 38 dopo 30 ore di incubazione; in entrambi, infatti, la tossina di riferimento era rilevata fino ad una diluizione di 10⁻⁶.

Accordo si è avuto anche nel saggio dei 71 filtrati fecali, con 53 casi positivi e 18 negativi. Risultati discordanti si sono, invece, ottenuti saggiando i filtrati delle brodoculture. Come mostrato nella Tabella 2, dei ceppi di C.difficile positivi al saggio ELISA 6 hanno trovato conferma su cellule; inoltre nel saggio immunoenzimatico si è riscontrata una positività anche per i

Tabella 1. - Confronto tra i risultati ottenuti con il sistema GMi-ELISA e quelli ottenuti su cellule Vero per ceppi di riferimento

Ceppi	"GMi-ELISA" +/- DO	risposta su cellule Vero
H 10407	+ 1,600	+++
P 263	+ 0,700	+++
P 99	+ 0,650	+++
B 7 A	+ 1,500	++
AP 1	+ 1,300	+++
711 (P 307)	+ 1,050	+++
P 16	- 0,260	-
AP 2	- 0,260	-
H 19	- 0,265	-
711.2	- 0,270	-

+++ > 75% di cellule modificate

++ $\geq$ 50% di cellule modificate

+ positivo

- negativo

Tabella 2. - Confronto tra i risultati ottenuti saggiando filtrati di brodocolture di 10 diverse specie di Clostridium mediante "ELISA-C.difficile" e saggio su cellule diploidi

Ceppi	Saggio su cellule diploidi (n° ceppi)		ELISA (n° ceppi)	
	positivi	negativi	positivi	negativi
<u>C.difficile</u>	6	1	7	
<u>C.sordellii</u>		7	7	
<u>C.bifermentans</u>		3	3	
<u>C.perfringens</u>		12		12
<u>C.butyricum</u>		8		8
<u>C.aurantibutyricum</u>		2		2
<u>C.sporigenes</u>		4		4
<u>C.innocuum</u>		3		3
<u>C.barati</u>		1		1
<u>C.clostridiiforme</u>		1		1

ceppi di C.sordellii e C.bifermentans.

Discussione

Entrambi i sistemi messi a punto si sono rivelati sensibili, specifici, affidabili e facilmente realizzabili.

Essi si propongono come valide alternative ai saggi su colture cellulari in quanto sono anche di esecuzione relativamente semplice, i reagenti sono stabili nel tempo garantendo la ripetitività dei risultati, non richiedono particolari attrezzature o esperienza come per le colture cellulari e forniscono un risultato obiettivo (valori in densità ottica, DO), invece di una interpretazione soggettiva delle alterazioni morfologiche su cellule.

Da sottolineare, inoltre, che nel caso di campioni clinici entrambi i sistemi forniscono una risposta entro 48 ore dall'arrivo dei campioni stessi.

Nel caso dell'ELISA-C.difficile la reattività crociata osservata con i ceppi di C.sordellii e C.bifermentans può essere imputabile alla presenza nell'antitossina utilizzata di anticorpi diretti contro antigeni comuni alle tre specie (4). Tali aspecificità non si osservano, tuttavia, per i filtrati fecali.

BIBLIOGRAFIA

1. MONTANARI, M.P., MAGLIANI, W., AMBROSOLI, G. & CHEZZI C. 1983. Ricerca della tossina termolabile di E.coli mediante saggio in microcolture di cellule Vero. Sierotipizzazione dei ceppi produttori. L'Ig. Mod. 80: 464-476.
2. RISTAINO, P.A., LEVINE, M.M. & YOUNG, C.R. 1983. Improved GM1-enzyme-linked immunosorbent assay for detection of E.coli heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 18: 808-815.
3. VOLLER, A., BIDWELL, D. & BARTLETT, A. 1976. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In: Manual of clinical immunology. M.R. Rose & H. Friedman (Eds.) Washington, DC. pp. 506-512.
4. EHRICH, M., VON TASSEL, R.L., LIBBY, J.M. & WILKINS, T.D. 1980. Production of C.difficile antitoxin. Infect. Immun. 28: 1041-1043.