

G001

SENSIBILITA' AL FLUCONAZOLO DI DIVERSI CEPPI DI CANDIDA ISOLATI DA MICOSI PROFONDE O MUOCO-CUTANEE. VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA TRA DUE DIVERSI METODI DI DETERMINAZIONE.

Sarnelli B., Abate R., Morelli M.L., Lambiase A., Ingala F.

Laboratorio di Patologia Clinica e Microbiologia -
P.O. "Ascalesi" Via E. a Forcella 31 - 80139 Napoli

Scopo dello studio, tuttora in corso, è quello di determinare la sensibilità al "Fluconazolo" di diversi ceppi di Candida, scelti con l'intento di valutare un campione di popolazione che sia il più possibile ampio per numero di specie e per sede di isolamento. Questo antifungino tiazolico, infatti, viene utilizzato nel primo approccio terapeutico di candidiasi diverse per sede e specie coinvolta più spesso di altri; ciò sia per considerazioni di natura economica, sia per alcune favorevoli caratteristiche relative alla farmacocinetica ed alla bassa tossicità del Fluconazolo, che ne rendono la gestione più agevole rispetto ad altri antimicotici.

Il metodo utilizzato è l'ETEST AB BIODISK che, per la sua buona riproducibilità e la semplicità di allestimento, risulta applicabile routinariamente rispetto ai più elaborati metodi di diluizione in brodo (NCCLS M27-A) da cui derivano i breakpoint interpretativi per diverse specie di Candida.

Tuttavia, nei casi di MIC > 16 g/ml, è stata verificata la concordanza dei risultati dell'Etest rispetto a quelli ottenuti con il metodo delle microdiluzioni (MDB).

Materiali e metodi. 132 ceppi appartenenti alle specie indicate in Tabella 1, identificati con il sistema ID32C Biomerieux sono stati isolati da 18 emocolture, 5 cateteri venosi, 39 espettorati, 7 broncoaspirati, 18 tamponi faringei, 19 tamponi vaginali, 10 cateteri vescicali, 12 drenaggi o tamponi da ferite chirurgiche, 4 colture di bile. Da tutti i ceppi, utilizzando inoculi pari a 0.5 McFarland ottenuti da colture di 24h, sono stati allestiti gli Etest su Agar Casitone modificato e su Sabouraud Destrosio Agar, incubando per 24 h a 35°C. La concordanza Etest-MDB è stata valutata in 26 ceppi (Tabella 2) con MIC > 16 g/ml, da cui sono stati allestiti inoculi in piastre Microtiter in cui erano state preparate microdiluzioni di Fluconazolo in RPMI 1640 (secondo NCCLS M27-A).

Tabella 1

Specie (n. isolati)	SENSIBILI n. (%)	SENSIBILI-DD n. (%)	RESISTENTI n. (%)
	MIC<16	MIC 16-32	MIC>32
<i>C. albicans</i> (53)	43 (81,13%)	6 (11,33%)	4 (7,54%)
<i>C. tropicalis</i> (29)	24 (82,76%)	4 (13,80%)	1 (3,44%)
<i>C. glabrata</i> (16)	7 (43,75%)	9 (56,25%)	0%
<i>C. krusei</i> (11)	0%	1 (9,09%)	10 (90,91%)
<i>C. parapsilosis</i> (15)	13 (86,66%)	1 (6,66%)	1 (6,66%)
<i>C. inconspicua</i> (3)	3 (100%)	0%	0%
<i>C. guilliermondii</i> (2)	2 (100%)	0%	0%
<i>C. rugosa</i> (2)	2 (100%)	0%	0%
<i>C. kefyr</i> (2)	2 (100%)	0%	0%

Tabella 2

CONCORDANZA % (n./tot)		
Ceppi	MDB - Etest	
Non Sensibili (n.)	SENSIBILE-DD	RESISTENTE
<i>C. albicans</i> (10)	83,33% (5/6)	100% (4/4)
<i>C. tropicalis</i> (5)	100% (4/4)	100% (1/1)
<i>C. parapsilosis</i> (2)	100% (1/1)	100% (1/1)
<i>C. glabrata</i> (9)	100% (9/9)	-

Risultati. Le Tabelle 1 e 2 riassumono rispettivamente i risultati delle MIC ottenute da tutti i ceppi con l'Etest (Tab. 1) e della percentuale di concordanza MDB-Etest secondo i breakpoint NCCLS, per 26 ceppi risultati non sensibili con il metodo Etest (Tab. 2).

Conclusioni. L'efficacia della sensibilità in vitro nell'essere predittiva del successo della terapia antifungina dipende sia da fattori clinici ed individuali, ma anche dal tipo di popolazione studiata. Il tentativo di ampliare in tal senso il punto di osservazione, oltre a confermare l'inefficacia del Fluconazolo su *C. krusei*, sembra evidenziare, nel nostro campione, la presenza non trascurabile di ceppi con Sensibilità-dose dipendente, secondo i breakpoint NCCLS, anche per specie diverse da *C. glabrata*.

G002

RHODOTORULA MUCILLAGINOSA: PICCOLO FOCOLAIO EPIDEMICO IN UN REPARTO DI TERAPIA INTENSIVA

Faneschi M.L., Rizzo A., Sticchi Damiani A., Pizzolante M., Perniola R.*

Laboratorio di Microbiologia *Unità Operativa di Terapia Intensiva Neonatale A.S.L. LEI - Presidio Ospedaliero "Vito Fazzi", Piazza F. Muratore, 73100 Lecce

Obiettivi della ricerca: L'incremento delle infezioni fungine può essere ascritto a più fattori: terapia immunosoppressiva, catterizzazione prolungata, uso di antibiotici a spettro sempre più ampio e lunga sopravvivenza di pazienti immunocompromessi. Sempre più frequentemente, grazie a tecnologie avanzate e a una maggior attenzione da parte del personale sanitario si isolano funghi diversi da *Candida albicans* e ritenuti fino a pochi anni or sono semplici contaminanti.

Descriviamo 5 casi di sepsi da *Rhodotorula mucillaginosa* verificatosi nel giro di un mese nel reparto di terapia intensiva neonatale del nostro nosocomio.

Rhodotorula mucillaginosa è un comune inquinante dell'aria. Nell'uomo può essere isolato da pelle, polmone, urine, feci, sangue, vagina, cavità orale e nella maggior parte dei casi è considerato un inquinante: sono stati però descritti in letteratura rari casi di infezioni sistemiche esattamente come avvenuto nei casi clinici sotto elencati.

CASI CLINICI:

	Pz. 1	Pz. 2	Pz. 3	Pz. 4	Pz. 5
S	F	F	F	M	F
SG	30	31	30	28	31
PN (g)	830	1,350	1,750	1,340	680
VA	Si	Si	Si	Si	Si
CO	Si	Si	Si	Si	Si

S: sesso, **SG:** settimane di gestazione, **PN:** peso alla nascita (grammi), **VA:** ventilazione assistita, **CO:** catetere ombelicale

Metodologia usata: L'emocolture, insemminate nei flaconi pediatrici BACTALERT, sono state incubate a 37° nello strumento BACTALERT 3D. La positività delle emocolture è stata segnalata fra la quinta e la settima giornata. L'esame microscopico diretto ha evidenziato la presenza di spore di miceti quindi si è provveduto alle subcolture su agar Sabouraud. A 48 ore dalla semina le piastre presentavano una crescita non rigogliosa di colonie bianco-rosate che con il passare dei giorni assumevano un colore decisamente rosa arancio. L'identificazione del micete è stata eseguita con card ID YST VITEK II. L'antimicogramma è stato eseguito con metodo E-test saggiando la sensibilità a Fluconazolo, Itraconazolo, Anfotericina B.

Risultati e conclusioni: I pazienti, trattati tutti con Anfotericina B e con rimozione dei cateteri sono perfettamente guariti e tutti i controlli successivi sono risultati negativi.

G003

RISPOSTA IMMUNE ANTI-CANDIDA: RUOLO DEI LINFOCITI VAGINALI IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI VAGINITE .

Boccanera M.,¹ Santoni G.,² Adriani D.,¹ Amantini C.,
Lucciarini R.,² Girolamo A.,¹ Cassone A.¹ F. De Bernardis¹

¹ Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia
² Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Medicina Sperimentale, Università di Camerino, Camerino, Italia

C. albicans è l'agente di una infezione vaginale, la vulvovaginite, che può presentarsi anche con episodi ricorrenti piuttosto gravi. Il meccanismo di difesa a livello vaginale non è stato ancora completamente chiarito: per valutare la risposta dell'ospite è stato impiegato un modello di infezione vaginale in ratte ovariectomizzate con caratteristiche simili alla malattia umana. Nell'animale una prima infezione con *Candida* è in grado di suscitare una consistente risposta immune ad una successiva infezione, mediante la produzione di anticorpi protettivi e l'aumento di linfociti attivati a livello mucosale.

È stato condotto uno studio sulle proprietà funzionali e protettive dei vari subsets di linfociti vaginali utilizzando il trasferimento adottivo di linfociti vaginali provenienti da animali infettati e successivamente inoculati per via intravenosa in ratte naive che poi ricevevano un challenge intravaginale con *C. albicans* nelle 24 ore successive alla vaccinazione adottiva. I linfociti adottivi trasferiti erano attivi in quest'ordine: CD4⁺ T linfociti ≥ CD5⁺ B linfociti ≥ CD8⁺ T linfociti.

È stata inoltre saggiata la loro capacità di proliferare dopo stimolazione con mitogeni quali PHA, PWD, LPS o mannanoproteina di *C. albicans*. I linfociti vaginali totali (CD3⁺ T linf., CD3⁺ CD4⁺ linf., e CD5⁺ B linf.) ottenuti da animali infetti, proliferano analogamente sia quando sono stimolati con i mitogeni classici che con la mannanoproteina specifica di *C. albicans*, mentre i CD3⁺CD8⁺ T linfociti hanno un minor grado di attivazione.

Infine, è stata saggiata la presenza di anticorpi anti-mannanoproteina di *C. albicans* nel supernatante di CD5⁺ B linfociti proliferati in presenza di T linfociti. I risultati dimostrano che è presente una cooperazione cellulare antiCandida a livello vaginale mediata da cellule e da anticorpi. Particolarmente importante è il ruolo svolto dalle cellule CD4⁺ T linfociti e dai CD5⁺ B linfociti.

G004

IDENTIFICAZIONE DI CANDIDA SPP. MEDIANTE SEQUENZIAMENTO CON ELETTROFORESI CAPILLARE

Bordi E., Paglia M.G., Nebuloso E., Pucillo L.P.

Laboratorio di analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia-Sezione di Microbiologia Molecolare, I.N.M.I. L. Spallanzani, IRCCS, Roma.

I metodi tradizionali per l'identificazione di *Candida spp.* includono l'esame al microscopio della morfologia del lievito

e l'allestimento di saggi biochimici per l'identificazione di specie. Sono stati sviluppati diversi sistemi in grado di identificare tali patogeni in poche ore, i quali però, pur consentendo una corretta identificazione delle specie più rilevanti clinicamente, possono risultare non conclusivi con ceppi di lieviti rari. I metodi basati sull'amplificazione del DNA ribosomale offrono una valida alternativa nella identificazione di specie, essendo i geni ribosomali costituiti da regioni conservate, identificabili con primer idonei, e frammenti di sequenze variabili utili per l'identificazione della specie.

Obiettivo. Effettuare una valutazione preliminare sull'utilizzo diagnostico di un sistema di sequenziamento automatico che consenta la diagnosi di specie di *Candida*, rispetto ai metodi tradizionali.

Materiali e Metodi. L'identificazione fenotipica dei lieviti isolati da materiali biologici (8 espettorati, 1 urina, 1 tampone faringeo), è stata eseguita con il sistema RapID Yeast Plus System (Remel). Per l'identificazione genotipica, il DNA estratto da colonie pure è stato amplificato, come descritto da Sandhu et al. (1). L'analisi delle sequenze nucleotidiche dei prodotti di amplificazione è stata eseguita, dopo purificazione, con "terminatori" marcati con sostanze fluorescenti mediante "Big Dye Terminator Sequencing kit v. 3.0" (Applied Biosystem), utilizzando lo strumento ABI-PRISM 3100. I dati relativi alle sequenze nucleotidiche sono stati confrontati con le sequenze depositate in banca dati.

Risultati. Il sistema RapID Yeast Plus System ha consentito di identificare: *C. krusei* (5/10), *C. paratropicalis* (1/10), *C. glabrata* (1/10), *C. parapsilosis* (1/10), *C. tropicalis* (2/10), mentre con il sequenziamento abbiamo ottenuto: *Saccharomyces spp* (4/10), *C. albicans* (1/10), *C. glabrata* (2/10), *C. tropicalis* (2/10) e una specie indeterminata.

Conclusioni. Il sequenziamento mediante elettroforesi capillare ha permesso di confermare la diagnosi fenotipica di *C. tropicalis*. Gli altri genotipi mostrano lievi differenze rispetto all'identificazione fenotipica e meritano ulteriori studi ed approfondimenti.

G005

CASO DI INFEZIONE RINO-FARINGEA INVASIVA DA MUCOR SPP.

Clerici P., Agrappi C., Vigano' E.F., Melloni P., Mazzone A*.

U.O. Microbiologia, * U.O. Oncologia Azienda Ospedaliera "Ospedale Civile di Legnano" Via Candiani 2-20025 Legnano (MI)

Introduzione Le zigomicosi sono le infezioni fungine acute a decorso più fulminante nei pazienti immunocompromessi. Sono causate da funghi appartenenti all'ordine Mucorales (Mucor, Rhizomucor, Absidia, Rhizopus). Più frequentemente colpiti sono il distretto cranio-rino-facciale ed il tessuto sottocutaneo. Il danno deriva dal particolare tropismo che questi funghi hanno per l'endotelio arterioso con infiltrazione dei vasi e conseguente necrosi tessutale.

Caso clinico Il presente caso si riferisce ad una paziente di 81 anni affetta dal novembre 2000 da mielodisplasia. A febbraio 2003 comparsa di stomatite aftosa ingravescente con disturbi nella deglutizione, dolore trafittivo laringo-faringeo e febbre. La paziente viene inizialmente messa in trattamento con Fluconazolo ma senza alcun miglioramento del quadro clinico. All'esame obiettivo si riscontra necrosi del palato duro con croste plurime siero ematiche nelle cavità nasali. La TAC evidenzia un ispessimento flogistico sottocutaneo a livello della regione temporo-zigomatica di sinistra. Si eseguono due tamponi nasali ed un tampone orofaringeo per l'e-

same microbiologico.

Esame microbiologico Già dopo 24 ore di incubazione su Sabouraud Dextrose Agar si osserva una crescita di colonie bianche lanuginose più rigogliosa sulla piastra incubata a temperatura ambiente. All'esame microscopico delle colonie con blu di lattofenolo si osservano sporangiofori ialini e lisci, assenza di rizoidi, sporangi globosi con columella ben evidente. Il fungo viene identificato come appartenente al genere *Mucor*.

Conclusioni Nonostante la tempestiva impostazione di terapia con Ambisone il quadro clinico evolve verso un sempre progressivo peggioramento fino all'exitus della paziente.

G006

INFEZIONE CUTANEA DA *CORYNEBACTERIUM AMYCOLATUM*.

De Santis A., *Mosca A., *Carucci A., Simone A., *Miragliotta G.

Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Ospedale San Paolo, *Cattedra di Microbiologia, Dip. MIDIM, Università di Bari.

I corineformi risultano sempre più frequentemente correlati a diverse patologie umane, soprattutto nei pazienti immunodepressi.

Si riporta il caso di un uomo di 65 anni, in buona salute, immunocompetente, giunto al Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Ospedale San Paolo, Bari, per valutazione microbiologica di una lesione cutanea produttiva persistente. La comparsa della lesione alla gamba sinistra risaliva a circa 3 anni prima, dopo intervento per sub-occlusione aortica a livello addominale, al quale era seguita prolungata depressione psichica. La lesione, inizialmente di tipo infiltrativo sottocutaneo, si era successivamente fistolizzata all'esterno, con formazione intorno all'ulcera di un'area infiammata ed edematosa con scarsa tendenza alla guarigione. Un primo esame microbiologico mise in evidenza *Mycobacterium xenopi*, pur senza alcun beneficio con relativa terapia specifica. Un ulteriore esame della lesione evidenziò presenza di elevata carica di bacilli difteroidi. Le colonie apparivano grigie e rugose, i batteri risultavano catalasi, ureasi e nitrato positivi, fermentanti. Il ceppo è stato identificato come *Corynebacterium amycolatum* utilizzando il sistema MIS-gas-cromatografia (Hewlett-Packard) che permette di identificare un microrganismo in base al profilo caratteristico degli acidi grassi. Il paziente è stato trattato con ciprofloxacina con miglioramento delle sue condizioni.

G007

CANDIDURIE: ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO, TERAPIA E EVOLUZIONE CLINICA. RISULTATI DI UNA INDAGINE NAZIONALE

Faggi E.¹, Farina C.², Lombardi G.³, Andreoni S.⁴, Manso E.⁵, Fazio P.⁶, Pini G.¹, Anichini P.⁷, Bonetti C.⁸, D'Accardo A.M.⁹, Fracchiolla S.¹⁰, Spinelli M.¹¹, Verna G.⁵

¹Dipartimento Sanità Pubblica - Università di Firenze,

²A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo - Bergamo,

³Ospedale di Circolo - Varese,

⁴A.O. Ospedale Maggiore della Carità - Novara,

⁵A.O. Umberto I - Ancona,

⁶P.O. Ospedale Spirito Santo - Pescara,

⁷A.O. Careggi - Firenze,

⁸Ospedale Maggiore - Crema,

⁹Ospedale Cervello - Palermo,

¹⁰A.O. SS. Annunziata - Taranto, ¹¹A.O. Ospedale S. Anna - Como

I molti interrogativi posti dall'isolamento di lieviti dalle urine stimolò il Comitato di Studio per la Micologia (CoSM) dell'AMCLI a proporre, a livello nazionale, una indagine epidemiologica sulle candidurie allo scopo di indagarne l'eziologia, i fattori di rischio, l'approccio terapeutico e l'evoluzione clinica e micologica.

L'indagine, rivolta soprattutto a pazienti ricoverati in reparti di Terapia Intensiva, ha previsto la registrazione di dati epidemiologici relativa a ciascun caso clinico.

Hanno aderito all'iniziativa 10 centri ospedalieri (Bergamo, Como, Crema, Novara, Varese, Ancona, Firenze, Pescara, Palermo, Taranto) e l'indagine ha avuto la durata di 15 mesi (1 ottobre 2001 - 31 dicembre 2002).

Sono state raccolte complessivamente 68 schede relative a pazienti ricoverati in reparti di Terapia Intensiva (39), reparti chirurgici (6) e medici (23).

I fattori di rischio maggiormente presenti furono: catetere urinario (presente nel 93% dei pazienti), terapia antibiotica (88%), nutrizione parenterale (61%), insufficienza renale (42%), interventi chirurgici (42%). La candiduria era spesso associata a febbre (60% dei pazienti) e ad infezioni batteriche (63%). Nella maggior parte dei casi fu asintomatica ma il sedimento urinario presentava quasi costantemente leucociti e globuli rossi.

Il 30% dei pazienti presentava anche candidosi orofaringea e/o lieviti nell'escreato e il 7% delle donne candidosi vaginale. Candidemia fu riscontrata in 4 pazienti.

C. albicans fu la specie maggiormente isolata dalle urine (62%), seguita da *C. glabrata* (16%), *C. tropicalis* (7%); salutarmente furono isolate altre specie.

C. albicans fu isolata dalle emocolture di tre pazienti, *C. glabrata* da un solo paziente: tali specie erano contemporaneamente presenti nelle urine ed in altri materiali patologici.

Al 53% dei pazienti fu somministrata una terapia antimicotica prevalentemente a base di fluconazolo. Gli altri pazienti non furono sottoposti a terapia antimicotica ma soltanto alla sostituzione del catetere urinario.

Oltre il 60% dei pazienti ebbe un miglioramento clinico che fu confermato, in molti casi, dalla risoluzione micologica dell'infezione.

G008

MICOSI SUPERFICIALI : CASISTICA PRESSO L'AMBULATORIO DI MICROBIOLOGIA - OSP. S. CHIARA DI TRENTO

Gaino M., Pedrotti C., Bassetti D., Caciagli P.

Microbiologia Immunologia - Ospedale S. Chiara TN

Obiettivi - Scopo dello studio è la valutazione della prevalenza di onicomicosi e dermatomicosi nei pazienti afferenti al laboratorio di Microbiologia per sottoporsi ad indagini micologiche, con particolare riguardo alla correlazione eziologica in rapporto alla sede di infezione.

Materiali e metodi - La compilazione di una scheda informativa del paziente, con particolare riferimento alla presenza di fattori di rischio ambientali-professionali per infezioni micotiche e all'assunzione di farmaci, unitamente alla descrizione particolareggiata della lesione, precede il prelievo di frammenti ungueali e di squame cutanee o da cuoio capelluto, eseguito dopo sgrassamento della cute o annessi con alcool al 70%. Il materiale così ottenuto viene inoculato in

Sabouraud Dextrose Agar (SDA) addizionato di cloramfenicolo per la ricerca colturale di lieviti e in SDA addizionato di cloramfenicolo e actidione per la ricerca di dermatofiti, incubati a temperatura ambiente e osservati ogni 24-48h per un periodo di 20 giorni. Sulle squame da scraping cutaneo viene altresì eseguito l'es. microscopico diretto (colorazione estemporanea con blu di lattofenolo). I miceti lievitiiformi vengono tipizzati con il Germ-test e con il sistema Api Can (Biomerieux), mentre l'identificazione dei dermatofiti viene eseguita osservando le caratteristiche morfologiche sia macroscopiche che microscopiche delle colonie isolate.

Risultati - Nel periodo gennaio 2002 - aprile 2003 sono stati effettuati su specifica richiesta 547 prelievi, di cui il 48,8% da squame ungueali, il 43,1% da squame cutanee e l'8,1% da cuoio capelluto; complessivamente 168 campioni sono risultati positivi, di cui il 58,3% per dermatofiti e il 41,7% per lieviti. Le micosi cutanee erano sostenute da lieviti nel 17,6% dei casi accertati e nell'82,4% da dermatofiti (41,2% *Trichophyton* sp. e 41,2% *Microsporum* sp.).

Nelle onicomicosi sono stati isolati con maggior frequenza lieviti del genere *Candida* (60,8% dei casi), seguiti da dermatofiti del genere *Trichophyton* (38%); in un caso è stato isolato *Microsporum* sp. Nel 50% dei casi positivi di campioni prelevati dal cuoio capelluto è stato isolato *Microsporum* sp.; nei rimanenti casi le micosi erano sostenute parimenti da *Trichophyton* sp. e da lieviti del genere *Candida*.

Conclusioni - La percentuale complessiva di positivi sul totale dei campioni esaminati è risultata pari al 30,7%; i lieviti del genere *Candida* sono gli agenti eziologici isolati con maggior frequenza nelle onicomicosi, mentre nelle micosi cutanee e del cuoio capelluto prevalgono i dermatofiti, senza significative differenze tra *Trichophyton* sp. e *Microsporum* sp.

G009

ISOLATI CLINICI DA CANDIDOSI VULVO-VAGINALI: SENSIBILITÀ AGLI ANTIFUNGINI

*Migliavacca R., *Asticcioli S., *Nucleo E., *Spalla M.,
*Giorgetti E., *Terulla C., *Sacco L.

^aDipartimento S.M.E.C. Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Pavia, via Brambilla 74, 27100 Pavia.

^bServizio Analisi Microbiologiche I.R.C.C.S. "S.Matteo", Viale Golgi 19, 27100 Pavia.

Le vulvo-vaginiti micotiche rappresentano un problema diffuso; sono per lo più causate da *Candida albicans*, ma anche da specie "non *albicans*", spesso più resistenti alle terapie convenzionali.

Scopo della ricerca: 112 lieviti sono stati raccolti negli anni 2000-2002: 95 da tamponi vaginali provenienti da pazienti afferenti all'ambulatorio di malattie sessualmente trasmesse del Policlinico di Pavia e dall'ASL, 17 da pazienti ospedalizzate. I lieviti sono stati valutati, anche in relazione allo stato di gravidanza (19 casi) ed alla frequenza di recidive (11 casi), sotto il profilo epidemiologico e della sensibilità in vitro ad anfotericina-B, itraconazolo, fluconazolo, cheticonazolo, 5-fluorocitosina e voriconazolo.

Metodologia: Per l'identificazione, oltre alla galleria API 20C AUX, è stata utilizzata l'apposita card biochimica Vitek (Biomérieux). I patogeni sono stati testati per la sensibilità agli antimicotici tramite il pannello Sensititre® YeastOne. L'interpretazione dei risultati è avvenuta in accordo al protocollo NCCLS M-27A.

Risultati: La specie più frequentemente isolata dalle pazienti ospedalizzate è stata *C. albicans*, seguita da *C. glabrata*; la situazione contraria si è verificata per gli isolati dalle pazienti gravide. Tra le recidive, la specie più rappresentata è stata *C. albicans*, seguita da *C. krusei*. La sensibilità agli antimicotici ha presentato notevole variabilità, correlata alla specie; *C. albicans* è risultata essere la specie più sensibile, nonostante, nell'arco dei due anni di studio, si sia osservato un aumento delle resistenze agli azoli. *C. glabrata* è risultata invariabilmente resistente al fluconazolo. Resistenze a fluconazolo ed itraconazolo si sono evidenziate in *C. krusei*. Il composto di maggior efficacia antimicotica, indipendentemente dalla specie testata, è stato il voriconazolo.

Conclusioni: l'aumento progressivo dei pazienti con candidiasi vulvo-vaginale, verificatosi nell'arco dei due anni, nonché la diminuzione della sensibilità ad itra- e chetoconazolo in specie quali *C. albicans* e *C. glabrata*, impongono un continuo monitoraggio delle resistenze per un corretto utilizzo dei nuovi derivati quali il voriconazolo, maggiormente attivi.

G010

SENSIBILITÀ AGLI ANTIMICOTICI DI CEPPI DI CANDIDA SPP. ISOLATI DA EMOCOLTURE DI PAZIENTI OSPEDALIZZATI NEL PERIODO 2000-2003

¹Venturelli C., ²Bedini A., ¹Carboni C., ¹Leporati G.,
²Codeluppi M., ²Guaraldi G., ¹Rumpianesi F.

¹Servizio di Microbiologia, ²Divisione di Malattie Infettive,
Azienda Ospedaliera Policlinico,
Via del Pozzo 71,
41100 Modena

Obiettivi: 1) determinare i patterns di sensibilità verso anfotericina B (AMB), 5-fluorocitosina (5-FC), fluconazolo (FLC), itraconazolo (ITC), nei confronti dei ceppi di *Candida* spp. secondo il metodo di riferimento internazionale NCCLS

2) istituire un programma di sorveglianza per isolamenti di *Candida* spp. da emocolture di pazienti ricoverati presso il Policlinico di Modena

Materiali e metodi: tra Gennaio 2000 e Marzo 2003 sono stati raccolti i dati relativi a 72 ceppi del genere *Candida* isolati da emocolture di 63 pazienti: 31 (42%) ceppi di *C. albicans*, 20 (28%) di *C. parapsilosis*, 8 (12%) di *C. tropicalis*, 6 (8%) di *C. glabrata*, 2 (3%) di *C. krusei*, 2 (3%) di *C. lusitanae*, 2 (3%) di *C. guilliermondii*, 1 (1%) di *C. pelliculosa*. Il saggio di sensibilità è stato eseguito con metodo di microdiluzione applicando le linee-guida M27A raccomandate dal National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Risultati: La resistenza al FLC ($\geq 64 \mu\text{g/ml}$) è stata osservata nel 9,7% dei ceppi isolati (2 *C. albicans*, 3 *C. tropicalis*, 2 *C. krusei*); la resistenza all'ITC ($\geq 1 \mu\text{g/ml}$) e la dose-dipendenza (0,25-05 $\mu\text{g/ml}$) si sono avute rispettivamente nel 16,6% (2 *C. albicans*, 3 *C. tropicalis*, 2 *C. krusei*, 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. glabrata*, 1 *C. pelliculosa*) e nel 5,5% degli isolamenti (1 *C. albicans*, 2 *C. glabrata*, 1 *C. tropicalis*); il 2,7% (2 *C. tropicalis*) degli isolati è risultato resistente alla 5-FC ($\geq 32 \mu\text{g/ml}$); nella nostra casistica ci sono stati 6 (8,3%) ceppi con una MIC per AMB $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ (2 *C. krusei*, 2 *C. lusitanae*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. glabrata*) di cui 2 isolati intrinsecamente resistenti.

Conclusioni: I risultati del nostro studio, in accordo con i dati della letteratura, indicano il ruolo preminente di *C. albicans*, ma altresì l'importanza di *Candida* non *albicans*; la significativa incidenza di infezioni del sangue di *C. parapsi-*

losis è comparabile al trend recentemente riportato da Centri d'Europa, Canada e America latina e da altri studi italiani. Per l'emergere delle resistenze tra *Candida* spp. agli azoli e per la inusuale, ma ben documentata (Sentry Program 1997-2000, Quebec Study) resistenza all'amfotericina B, il saggio di sensibilità agli antifungini e la valutazione del trend di sensibilità nelle candidemie, stanno diventando di importanza crescente per il laboratorio di Microbiologia, specialmente nei Centri con pazienti ad alto rischio, sebbene sia necessario approfondire alcuni aspetti metodologici nella esecuzione e nella interpretazione del saggio per migliorare la standardizzazione e meglio valutare le correlazioni tra il dato di laboratorio e la clinica dei pazienti.
Venturelli.c@policlinico.mo.it

G011

KATO-KATZ TEST IN UNA INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SU *SCHISTOSOMA MANSONI* IN MADAGASCAR

Bruno R., Caldera D., Cornacchiari M., Lasagna C., Sanlorenzo M.

Equipe Sanitaria Ospedale "S. Croix" Isoanala - Madagascar

Schistosoma mansoni infesta circa 2 milioni di persone in Madagascar. Il nostro studio, effettuato in una regione del sud dell'isola, ha lo scopo di valutare la prevalenza, presso la popolazione di quella regione, dell'infestazione da *S. mansoni*.

Materiali e metodi: Nel novembre 2002, presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale S.Croix di Isoanala (sud Madagascar), abbiamo sottoposto ad indagine parassitologica 171 alunni (48% maschi, 52% femmine) delle scuole elementari di Isoanala. Gli alunni scelti "random" (10 per ciascuna classe) erano di età compresa tra i 5 e i 14 anni.

I campioni di feci sono stati esaminati con la tecnica di diafanizzazione secondo Kato-Katz allo scopo di dimostrare non solo la presenza delle uova di parassita, ma anche di darne una valutazione quantitativa.

Risultati: Di 171 campioni testati, 118 sono risultati positivi (69%) per diverse specie di parassiti, mentre 53 campioni (31%) erano esenti da infestazione da elminti.

Complessivamente sono stati evidenziati 132 parassiti: 13 soggetti sono infatti risultati pluriparassitati (2-3 specie diverse di elminti).

La presenza di uova di *Schistosoma mansoni* è stata rilevata in 107 campioni (62,5%).

Su questi è stato valutato il grado di parassitemia secondo le indicazioni dell'OMS: 36 soggetti (33,6%) presentavano una parassitemia di grado lieve, 39 (36,4%) di grado medio, infine 32 soggetti (29,9%) avevano un numero di uova/gr. feci superiore a 400 e pertanto una parassitemia grave.

Conclusioni: Conoscere l'entità dell'infestazione da *Schistosoma mansoni*, in termini di numero di uova, è indispensabile per riconoscere la gravità della malattia e prevederne la prognosi.

La diafanizzazione delle feci secondo Kato-Katz rappresenta pertanto il metodo di elezione per la diagnosi delle schistosomosi intestinali, in quanto è un metodo di arricchimento ed insieme quantitativo.

Il nostro studio ha dimostrato anche nelle regioni del sud Madagascar una elevata prevalenza della malattia: 62,5% di soggetti infestati da *Schistosoma mansoni*.

G012

ANTICORPI NATURALI (NOA) VERSO *TOXOPLASMA GONDII* IN GRAVIDANZA: IL RUOLO DELLA CHEMILUMINESCENZA

Frulio R., Palmero C., Cirillo C., Belli ML., Fenu L., Ugolotti E. e Ceccarelli R.

Laboratori Clinica Malattie Infettive Università di Genova - IRCCS G.Gaslini, Lg. G. Gaslini 5 - 16147 Genova

Le IgM anti *Toxoplasma gondii* sono considerate un marcatore di infezione acuta. L'esperienza con la sierologia IgM nella diagnostica della Toxoplasmosi evidenzia di tre tipologie di positività: clinicamente rilevante (CR), clinicamente non rilevante (CNR) ed infine correlata ad anticorpi naturali (NOA). Durante la gravidanza la presenza di CNR e NOA è quantitativamente significativa così come l'interpretazione è critica per gli alti costi umani (stress ed aborti) e sanitari (controlli e terapie non necessarie).

L'obiettivo è stabilire l'efficacia di diverse metodiche di laboratorio (Immunoagglutinazione, Immuno enzimatica con rilevazione in fluorescenza ed Immuno enzimatica con rilevazione in chemiluminescenza) nella diagnosi di IgM tipo NOA su di un singolo prelievo.

Pazienti Tutte le pazienti in gravidanza pervenute al nostro Centro con IgG negative ed IgM positive nel periodo Gennaio 2000 Dicembre 2002

Metodi IgG ed IgM vs. *T.gondii* con metodica ELFA (BioMérieux, F) e con metodica in chemiluminescenza LIAISON (DiaSorin IT)-, IgM con metodica ISAGA (BioMérieux, F)

Risultati Sono risultate ammissibili 38 pazienti su 454 pervenute al centro. Sulla base del follow-up clinico e sierologico 8 sono risultate IgM di tipo CR mentre 30 sono risultate di tipo NOA. Nei 38 pazienti studiati gli indicatori di efficacia sul primo prelievo sono stati per ELFA IgM specificità 50% accuratezza 55,9% valore predittivo del test positivo 21.1% per LIAISON IgM specificità 73.2% accuratezza 77.6% valore predittivo del test positivo 42.1%, per ISAGA specificità 68.2% accuratezza 73.1% valore predittivo del test positivo 36.4%.

Conclusioni Nelle pazienti in gravidanza studiate le metodiche LIAISON ed ISAGA sono risultate sensibilmente più efficaci nella diagnosi di IgM di tipo NOA su di un singolo prelievo rispetto ad ELFA. La possibilità di automazione della metodica in chemiluminescenza consente di attribuirle un importante ruolo come test di primo livello nello screening della Toxoplasmosi in gravidanza.

G013

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ISOLATI UMANI DI *GIARDIA DUODENALIS*

Di Cave D., Berrilli F., Orecchia P.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università di Roma "Tor Vergata", Via Montpellier 1, 00133 Roma; Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Tor Vergata Viale Oxford 81, 00133 Roma

Il flagellato intestinale *Giardia duodenalis* (syn *G. intestinalis*; *G. lamblia*) è tra i più importanti parassiti umani e una delle più comuni cause di diarrea di origine non virale o bat-

terica dell'uomo e di specie animali domestiche e selvatiche. L'infezione si realizza attraverso l'ingestione di acqua e/o cibo contaminati e attraverso il contatto diretto oro-fecale ma non è al momento del tutto conosciuto il contributo relativo delle diverse modalità di trasmissione alla diffusione del parassita nell'uomo. La caratterizzazione molecolare e l'analisi filogenetica di isolati di *G. duodenalis* provenienti da diversi ospiti ha rivelato l'esistenza di sette maggiori genotipi (A-G) dei quali solo due, A e B, descritti anche nell'uomo.

Obiettivo della presente ricerca è stato quello di caratterizzare dal punto di vista molecolare isolati di *Giardia* ottenuti da campioni fecali umani (n=6) raccolti presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia del Policlinico Azienda Ospedaliera Universitaria Tor Vergata, con lo scopo di contribuire alla conoscenza della diffusione dei diversi genotipi nel nostro paese.

Il DNA genomico estratto dalle cisti è stato amplificato per ottenere un frammento della regione 5' del gene 16SrRNA (290 bp). In caso di negatività della reazione è stata effettuata una PCR seminestata utilizzando un primer interno opportunamente disegnato. I prodotti di PCR sono stati quindi purificati e sequenziati. Le sequenze ottenute sono state allineate usando il programma CLUSTALW.

Lo studio delle sequenze ha consentito di definire i genotipi di appartenenza degli isolati, cinque sono stati attribuiti all'Assemblaggio A, uno all'Assemblaggio B.

La caratterizzazione molecolare degli isolati contribuisce alla determinazione delle origini dell'infezione e ad una maggiore comprensione della trasmissione zoonotica e potrà fornire informazioni utili per una possibile correlazione tra sintomatologia clinica e genotipi.

G014

DESCRIZIONE DI UN CASO DI OFTALMOMIASI ESTERNA CAUSATA DA *OESTRUS OVIS*

Fazii P.¹, Cosentino L.¹, Carusi T.², Maroli M.³, De Cono P.¹, Clerico L.¹, Morano C.¹, Riario Sforza G.¹

¹Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia,

²Divisione di Oculistica, P.O. "Spirito Santo",

Via Fonte Romana, 8, 65124 Pescara,

³ Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità,

Via Regina Elena 299, 00161, Roma

Oestrus ovis è un dittero parassita di animali e occasionalmente dell'uomo. Il suo parassitismo si esplica con la necessità della mosca adulta di inoculare le proprie larve all'interno delle cavità, come la narice o le fauci, di un animale a sangue caldo. Le larve si sviluppano subendo delle mute nelle cavità dell'ospite, solitamente ovini e caprini, e talora possono migrare in altri distretti causando, ad esempio, l'invasione dei seni frontali. Talora anche l'uomo può essere parassitato anche se, nella nostra specie, non vi è l'evoluzione completa del ciclo biologico. Descriviamo un caso di infestazione da larve di *Oestrus ovis* pervenuto alla nostra osservazione nel giugno 2002. Si è trattato di un soggetto di 50 anni di professione muratore residente nell'entroterra pescarese. Il soggetto presentava una fastidiosa congiuntivite acuta bilaterale che lo ha spinto a consultare l'ambulatorio oculistico del nosocomio pescarese. A livello sia del fornice congiuntivale superiore che di quello inferiore, erano presenti numerose piccole larve che all'esame morfologico sono risultati appartenere alla specie *Oestrus ovis*. Le numerose larve (circa una quindicina) sono state tutte asportate manualmente dall'oculista che in questa maniera ha brillantemente risolto il problema. Presentiamo il caso per la rarità dell'osservazione nel pescarese, benché in Abruzzo, terra di

pastorizia, le segnalazioni non siano insolite.

G015

LEISHMANIOSI IN PAZIENTE CON L.E.S.: CROSS - REATTIVITA' TRA ANTIGENI DI LEISHMANIA E MICOBATTERI.

Petagna C., Grisolia V., Avagliano G., Piccoli S.

Servizio Speciale di Microbiologia, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Facoltà di Medicina e Chirurgia
via Pansini, 5 80131 Napoli

Il laboratorio di analisi è indispensabile al clinico per la diagnosi di leishmaniosi.

Riportiamo il caso clinico di una paziente di 39 anni ricoverata in Clinica Medica presso il Policlinico Universitario Federico II° per una probabile riacutizzazione di L.E.S. già diagnosticata e in trattamento da circa 10 anni.

La paziente presentava febbre continuo - remittente da circa 10 giorni, sudorazione profusa, malessere generale, tosse secca e persistente.

Venivano inviati presso il nostro laboratorio di Microbiologia indagini colturali su materiali biologici tra cui la ricerca del *Mycobacterium tuberculosis* su espettorato e liquido di lavaggio bronco - alveolare, che davano, alla colorazione di Ziehl - Neelsen risultato negativo, tale risultava essere anche l'esito della RX toracica, mentre la ricerca specifica degli anticorpi IgG e IgM risultava fortemente positiva (A 60).

Questo quadro anomalo ci indusse a sospettare una probabile interferenza al T.B.test; pertanto in base alla documentata cross reattività tra gli antigeni di M.t. e quelli della Leishmania, abbiamo eseguito il test in I.F.I. per la ricerca di anticorpi anti- Leishmania il quale è risultato positivo con un titolo di 1:2560 (v.positivo =>1:80).

Tale risultato associato a un quadro di ingravescenza pancytopenia, ha confermato la diagnosi, tanto che la paziente sottoposta a terapia specifica con Ambisone mostrava una progressiva remissione della sintomatologia clinica e dei dati ematochimici.

I controlli sierologici a 6 e 12 mesi mostravano un progressivo abbassamento del titolo anticorpale.

Da quanto esposto si può evidenziare che:

- La diagnosi di laboratorio è essenziale in alcune patologie quali la leishmaniosi.
- La metodica di elezione per la diagnosi di Leishmania è la ricerca in I.F.I degli anticorpi specifici
- La documentata cross - reattività tra antigeni di Leishmania e Micobatteri ci fa proporre, nei casi di positività del T.B test in pazienti che clinicamente e in coltura non presentano conferma diagnostica per infezione da Micobatterio, l'esecuzione del test in I.F.I. per anticorpi anti Leishmania, onde escludere tale patologia a prognosi infausta se diagnosticata nella fase terminale.

G016

LA METODICA DI KATO-KATZ NELLA RICERCA DI PARASSITI INTESTINALI: NOSTRA ESPERIENZA IN MADAGASCAR

Sanlorenzo M., Lasagna C., Bruno R., Caldera D., Crema F., Titano A., Cornacchiari M.

Equipe Sanitaria Ospedale "S. Croix" Isoanala - Madagascar

Le parassitosi intestinali rivestono un ruolo di primaria importanza nel campo della salute pubblica in Madagascar ma la loro prevalenza è ampiamente sottostimata a causa della mancanza di mezzi, personale e centri equipaggiati per tali indagini.

Materiali e metodi: Nel mese di novembre 2002 abbiamo effettuato una ricerca sulla prevalenza di alcune parassitosi intestinali nel villaggio di Ambohimandroso, situato nella regione centrale del Madagascar, utilizzando la metodica di diafanizzazione secondo Kato-Katz.

Sono stati esaminati 108 campioni fecali di soggetti compresi nella fascia di età 6-18 anni, afferenti alle scuole della locale missione.

I soggetti da esaminare sono stati estratti a sorte, seguendo la tecnica epidemiologica "en grappe". Ogni mattina hanno consegnato il materiale fecale, che è stato immediatamente esaminato al microscopio previa preparazione seguendo la tecnica di Kato-Katz.

Risultati: Sono stati esaminati 108 campioni fecali provenienti da 48 soggetti maschili e 60 femminili.

61 soggetti (56,5%) sono risultati positivi per uno dei seguenti parassiti: *Ascaris lumbricoides*, Hookworm, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Taenia* spp., *Trichuris trichiura*, con una netta prevalenza di *Ascaris lumbricoides* (41 casi). In 11 casi abbiamo evidenziato una duplice infestazione, mentre in 5 casi era presente una triplice o quadruplicata infestazione.

La ricerca è stata inoltre estesa alla valutazione quantitativa delle uova dei parassiti considerati onde valutare l'intensità del parassitismo sulla base della quantità di uova per grammo di materiale fecale.

I casi affetti da *Ascaris* hanno presentato una quantità media di 9200 uova/gr fecale (range 24-48.000); quelli affetti da *Anchilostoma* 494 uova/gr fecale (range 24-2520); quelli affetti da *Trichuris* 156 uova/gr fecale (range 24-504).

Conclusioni: L'indagine fecale con la metodica di Kato-Katz è particolarmente valida negli studi di prevalenza sulle parassitosi intestinali: è facile da applicare sul campo, non richiede una tecnologia particolarmente sofisticata ed il costo è sostenibile anche per un paese particolarmente povero. La valutazione quantitativa fornita dalla metodica permette inoltre di valutare l'intensità del parassitismo e la sua gravità in relazione alle manifestazioni cliniche ed è di aiuto per instaurare programmi sanitari mirati al trattamento farmacologico di queste patologie.

G017

LIVELLI ENDOGENI INTRAEPATICI DEGLI mRNA PER IFN ALFA E GAMMA IN SOGGETTI CON COINFEZIONE DA HCV/HIV ED IN SOGGETTI CON INFEZIONE SINGOLA DA HCV

Abbate I., Cappiello G., Longo R., Antonucci G., Rosati S., Tocci G., Capobianchi MR* e Spanò A.

*Servizio di Microbiologia Ospedale "S. Pertini" ed *Istituto Nazionale per le Malattie Infettive I.R.C.C.S. "L. Spallanzani", Roma*

Premessa: Dati epidemiologici indicano che la coinfezione con HIV accelera ed aggrava il decorso clinico dell'infezione da HCV, con più rapido deterioramento della istologia e delle funzioni dell'organo e una accelerata evoluzione verso la comparsa di carcinoma epatico. Non è chiaro se il fenomeno sia da imputare all'alterata risposta immune, o se i fattori virologici abbiano un ruolo intrinseco.

Recenti nostri dati hanno mostrato che i livelli intraepatici dei messaggeri dei geni dell'IFN e di alcune proteine legate all'azione di tali citochine risultano alterati in confronto ai livelli che si riscontrano in altre patologie epatiche di natura non infettiva.

Obiettivi: Lo studio si propone di analizzare i livelli endogeni intraepatici degli mRNA specifici per l'IFN- α e- γ nei soggetti coinfezati HCV/HIV, e la correlazione con viremie plasmatiche HIV e HCV, numero di linfociti T CD4 ed istologia epatica. Come gruppo di riferimento per la comparazione, vengono utilizzati soggetti infetti soltanto con HCV.

Metodi: Sono state analizzate le biopsie epatiche di due gruppi di pazienti, con infezione doppia da HIV ed HCV o con sola infezione da HCV, con caratteristiche demografiche simili, in cui erano rappresentati i genotipi di HCV prevalenti nelle nostre regioni (1a, 1b, 2a/2c, 2b e 3a). Le biopsie sono state sottoposte ad estrazione di RNA, ed i livelli endogeni dei messaggeri specifici per gli IFNs sono stati misurati mediante RT-PCR in diluizione limite, in rapporto all'espressione di un gene costitutivo (β -actina). La viremia plasmatica HCV è stata misurata mediante Amplicor HCV Monitor (Roche), la viremia HIV è stata determinata con il metodo bDNA (Bayer). L'analisi istopatologica sulle biopsie epatiche stata condotta assegnando uno *score* numerico all'entità del danno epatico (*score* di Knodell).

Risultati: I livelli endogeni intraepatici dell'mRNA per IFN- α nei soggetti coinfezati HCV/HIV sono tendenzialmente superiori a quelli riscontrati nei soggetti HCV singolarmente infetti. Inoltre, nel gruppo dei coinfezati il livello di HIV-1 in circolo sembra favorire la presenza di mRNA per IFN- α . Per quanto riguarda i livelli endogeni intraepatici di mRNA per IFN- γ nei soggetti HCV/HIV coinfezati è stata riscontrata una down-regolazione rispetto al gruppo dei singoli HCV-infetti. Non è stata osservata alcuna relazione tra il numero di linfociti T CD4 nei soggetti coinfezati ed i livelli endogeni di IFN- α e- γ . Sia nei soggetti coinfezati HIV/HCV sia in quelli singolarmente infetti con HCV non è stata riscontrata correlazione tra alte cariche virali (HCV e/o HIV) ed entità del danno epatico.

Conclusioni: Da questi risultati preliminari emergono indicazioni che nei soggetti coinfezati HCV/HIV esistano degli aumentati livelli di mRNA per IFN- α ed una down-regolazione dei messaggeri specifici per l'IFN- γ rispetto a pazienti con sola infezione da HCV. Sembra inoltre che l'HIV circolante, e non i parametri di immunocompetenza, siano i fattori determinanti di tale fenomeno.

Sarà quindi necessario approfondire lo studio dei parametri

di attivazione intraepatica del sistema IFN nel corso della coinfezione HCV/HIV, e di estenderlo in relazione sia al potenziale ruolo nella patogenesi della malattia, sia ad una possibile recupero della funzione epatica in corso di terapia antiretrovirale HAART.

G018

INFEZIONE DA HPV E LESIONI CERVICALI ASSOCIATE: SCREENING IN DONNE HIV SIEROPOSITIVE

Ambretti S., Venturoli S., Cricca M., Bonvicini F., Gallinella G., Manaresi M., *Lenzi M., *Iarlori S., Musiani M., Zerbini M.

*Dip. di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale, Sez. di Microbiologia, Università di Bologna, Via Massarenti 9, 40138 Bologna; *Azienda USL Città di Bologna, U.O. Ostetricia e Ginecologia, Via dell'Arcoveggio 50/3, 40129 Bologna.*

Numerosi studi hanno evidenziato nelle donne HIV sieropositive (HIV+) una maggiore prevalenza di infezioni da papillomavirus umani (HPV) e di lesioni intraepiteliali squamose (SIL) a livello della cervice uterina rispetto alle donne HIV sieronegative (HIV-). Tali lesioni presentano in queste pazienti una maggiore tendenza alla persistenza e, se non trattate, alla progressione a carcinoma invasivo della cervice (neoplasia inclusa fra le patologie che definiscono la diagnosi di AIDS). L'attendibilità del Pap test in donne HIV+ risulta diminuita a causa dei frequenti fenomeni infiammatori, che determinano un maggior numero di falsi negativi; per questo motivo, risulta particolarmente importante nei programmi di screening rivolti a questo gruppo di popolazione affiancare alla citologia indagini virologiche.

In questo studio abbiamo analizzato 99 campioni citologici cervicali provenienti da 76 donne HIV+. La ricerca del DNA di HPV ad alto rischio oncogeno è stata effettuata mediante il test di ibridazione in fase liquida Hybrid Capture II (HC-II); i campioni risultati positivi sono stati successivamente analizzati mediante PCR-ELISA, allo scopo di ottenere la genotipizzazione dell'HPV rilevato dall'HC-II. Al momento del prelievo per il test virologico, su tutte le pazienti è stato eseguito anche un prelievo eso-endocervicale per l'esame citologico.

Dei 99 campioni, 31 (31.3%) sono risultati positivi per il DNA di HPV mediante HC-II. Se rapportata ai risultati del Pap test, la percentuale di positività al DNA di HPV è risultata essere del 73.7% in pazienti con citologia positiva (presenza di SIL di basso o alto grado) e del 21.3% in donne con citologia negativa o dubbia.

I nostri risultati confermano quindi come il test virologico di ricerca del DNA di HPV rappresenti una parte fondamentale dello screening per la prevenzione delle neoplasie cervicali nelle donne HIV+ in quanto permette di identificare una rilevante percentuale di pazienti a rischio risultate negative all'esame citologico.

G019

INCIDENZA DELLE INFEZIONI DA VIRUS RESPIRATORIO SINCIZIALE IN UN CAMPIONE DI PAZIENTI DI ETÀ PEDIATRICA.

Arcangeletti M.C., Pinardi F., De Conto F., Medici M.C., Valcavi P., Ferraglia F., Calderaro A., Chezzi C., Dettori G..

Sezione di Microbiologia - Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio. Università degli Studi di Parma. Viale A. Gramsci, 14. 43100 Parma

Obiettivi

I virus respiratori sono molto frequentemente in causa nel sostenere infezioni in età pediatrica, come pure infezioni nosocomiali. Il principale obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'incidenza delle infezioni da virus respiratori in pazienti di età pediatrica, con particolare attenzione alla possibile insorgenza di infezioni acquisite nel corso della degenza ospedaliera.

Risultati

Lo studio è stato effettuato su secrezioni respiratorie di pazienti di età pediatrica, ricoverati presso l'Ospedale Maggiore di Parma nel periodo ottobre 2002 - aprile 2003; sono stati applicati metodi diagnostici rapidi, volti alla ricerca di proteine virus-specifiche direttamente nel campione clinico o previa coltura di 24 ore mediante reazione di immunofluorescenza, come anche di metodi culturali tradizionali, per l'isolamento ed identificazione di agenti virali.

Su 687 campioni analizzati, 205 (29,8%) sono risultati positivi per almeno una specie virale responsabile di infezioni dell'apparato respiratorio. Nell'ambito dei campioni positivi, 121 (59,02%) hanno evidenziato la presenza di virus respiratorio sinciziale, 30 (14,63%) quella di adenovirus, 20 (9,76%) influenza A, 15 (7,32%) picornavirus, 5 (2,44%) *Herpes simplex* tipo 1, 7 (3,42%) parainfluenza tipo 3, 4 (1,95%) citomegalovirus, 3 (1,46%) parainfluenza tipo 1.

L'analisi dei campioni positivi per virus respiratorio sinciziale, estesa anche agli aspetti clinici ed anamnestici dei piccoli pazienti, ha messo in evidenza che almeno 4 casi avevano le caratteristiche di infezione nosocomiale. Nei suddetti casi, il reparto di appartenenza era la Neonatologia; i neonati implicati nei suddetti casi di infezioni nosocomiali erano tutti prematuri e presentavano quadri clinici di rilevante gravità.

Conclusioni

L'elevata incidenza delle infezioni da virus respiratorio sinciziale, quale quella rilevata in pazienti pediatrici, la facilità di trasmissione di tale agente virale ed i quadri clinici di particolare gravità, soprattutto in alcune categorie di pazienti, quali neonati ricoverati in reparti di terapia intensiva, fanno sì che, a tutt'oggi, questo virus sia ancora da considerare ad elevato impatto sulla salute umana. Il rilevamento puntuale e precoce di queste infezioni attraverso metodi diagnostici rapidi ed affidabili, con possibilità di refertazione entro poche ore dall'arrivo del campione in laboratorio, continua a mostrarsi indispensabile al fine di fornire un supporto efficace sia nel controllo che nella prevenzione delle infezioni nosocomiali.

G020**DETERMINAZIONE DELLA VIREMIA E VIRURIA DEI POLIOMAVIRUS BK E JC MEDIANTE DUPLEX-NESTED PCR IN TRAPIANTATI RENALI**

Bergallo M., Merlino C., Sinesi F., Daniele R., Granero V., Giachino F., Segoloni G.P., Cavallo R.

Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C. D.U. Virologia, Università di Torino

*S.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Ivrea (Torino)

**Dip. Medicina Interna, Unità Trapianto Renale, Università di Torino

Le infezioni da poliomavirus BK e JC (BKV e JCV) nei portatori di trapianto renale si verificano indipendentemente, ma possono anche verificarsi infezioni concomitanti e persistenza contemporanea di entrambi i virus. Questi soggetti sono suscettibili all'azione di entrambi i virus non solo come risultato della loro riattivazione, ma anche perché possono essere introdotti nell'organismo attraverso l'organo trapiantato. In numerosi studi il BKV è stato correlato con la nefrite interstiziale nei portatori di trapianto renale, in cui il trattamento immunodepressivo sembra indurre o almeno permettere la riattivazione del virus. Recentemente è stato ipotizzato che nei trapiantati renali alcuni casi di nefropatia possano essere associati al JCV. Nel presente lavoro abbiamo studiato l'infezione da BKV e/o JCV, valutando la presenza del BKV- e JCV-DNA nei campioni di urina e di siero ottenuti da 51 trapiantati renali e da 29 controlli sani, mediante una duplex-nested PCR messa a punto nel nostro laboratorio. L'escrezione urinaria del BKV-DNA (49%) nei soggetti immunodepressi è risultata in accordo con i dati della letteratura. L'incidenza della viremia da BKV è risultata marcatamente inferiore rispetto alla viruria (23,5% vs. 49%). L'incidenza della viruria da JCV è risultata nettamente inferiore rispetto a quella da BKV (15,7% vs. 49%) mentre l'incidenza della viremia da JCV è risultata relativamente alta (11,8%). Per quanto riguarda il rapporto tra il tipo di trattamento immunodepressivo (tacrolimus vs. ciclosporina A) e l'attivazione dell'infezione da BKV e/o JCV, il nostro studio non ha evidenziato correlazione, dal momento che è stata trovata una percentuale di attivazione (presenza di BKV e/o JCV viremia e/o viruria) simile nei due gruppi di terapia per entrambe le infezioni. I nostri risultati, inoltre, non indicano una correlazione tra l'infezione attiva da BKV e/o JCV e una diminuzione della funzionalità renale.

G021**FOLLOW UP DELLA CARICA VIRALE DELL'EBV NEI LINFOMONOCITI DI TRAPIANTATI RENALI MEDIANTE UN PROTOCOLLO DI PCR QUANTITATIVA**

Bergallo M., Merlino C., Fumagalli M., Tarallo S., Scutera S., Giachino F., Negro Ponzi A., Cavallo R.

Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U. Virologia, Università degli Studi di Torino

*Dip. di Nefro-Urologia, U.O.A. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Ivrea (Torino)

Nei portatori di trapianto renale è riportato un aumentato rischio di disordini linfoproliferativi (PTLD) che consistono in un ampio spettro di manifestazioni, dall'iperplasia linfoi-

de ai linfomi. E' stata descritta un forte correlazione tra l'infezione da EBV, il grado di immunodepressione e l'insorgenza di PTLD; in particolare, il rischio è influenzato dallo stato sierologico per l'EBV del ricevente al momento del trapianto. Recentemente, è stata descritta una correlazione tra l'incidenza della PTLD e la quantità di EBV-DNA nel plasma e nei linfomonociti circolanti, misurata mediante PCR quantitativa. La valutazione della carica virale nel sangue periferico sembra perciò essere un utile indicatore prognostico del rischio di PTLD. Questo lavoro riporta i risultati ottenuti nel monitoraggio mensile, per 6 mesi, della carica virale dell'EBV in 15 trapiantati renali. Il numero delle copie di EBV-DNA è stato valutato nei linfomonociti, mediante una PCR messa a punto nel nostro laboratorio. Otto pazienti erano in trattamento immunodepressivo con tacrolimus (FK506), 7 in ciclosporina A (CyA). Al trapianto, 14 pazienti erano EBV sieropositivi, mentre 1 era sieronegativo. Per tutta la durata dello studio nessun paziente ha sviluppato PTLD. Durante il periodo di osservazione, in 4/14 (28,6%) dei pazienti sieropositivi il numero delle copie genomiche è rimasto inferiore o uguale a 100; in 4/14 (28,6%) ha raggiunto il valore di 500 almeno una volta durante lo studio, in 5/14 (35,7%) ha raggiunto il valore di 1000, e solo in 1/14 (7,1%) ha raggiunto il valore di 5000. Il paziente EBV sieronegativo ha sempre presentato un numero di genomi virali inferiore alla soglia di sensibilità. Per quanto riguarda la relazione tra il tipo di terapia immunodepressiva e la carica virale, 4/6 (66,7%) dei pazienti che ha presentato valori maggiori o uguali alle 1000 copie genomiche, erano in trattamento con FK506 mentre solamente 2/6 (33,3%) erano in trattamento con CyA.

G022**RICERCA DEL DNA DI HPV IN DONNE CON VIN O CARCINOMA SQUAMOSO DELLA VULVA**

Bonvicini F., Ambretti S., Cricca M., Venturoli S., Gentilomi G., *Paterini P., *Santini D., *Ceccarelli C., Zerbini M., Musiani M.

Dip. di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale, Sez. di Microbiologia, e *Dip. Clinico di Scienze Radiologiche e Istocitopatologiche, Università di Bologna, Via Massarenti 9, 40138 Bologna

Il carcinoma della vulva rappresenta il 5% dei tumori maligni genitali femminili: considerando l'incidenza dei tumori in questa regione, circa il 90% delle neoplasie è costituita da carcinomi squamocellulari, mentre più raramente essa è sede d'insorgenza di altri tipi di neoplasia.

I carcinomi squamosi della vulva sono distinguibili in due gruppi con eziologia e distribuzione che variano a seconda delle fasce d'età: i carcinomi cheratinizzanti sono tipici della donna anziana (70 anni), sono associati a lesioni di tipo distrofico e sembrano originare da neoplasie intraepiteliali (VIN) di tipo differenziato. I carcinomi basaloidei e bowenoidi sono tipici della donna giovane (età media: 55 anni), possono svilupparsi da VIN indifferenziati, e sono frequentemente associati alla presenza di DNA di papillomavirus umani (HPV).

Nel nostro studio abbiamo ricercato con tecniche di PCR-ELISA e ibridazione in situ il DNA di HPV ad alto rischio oncogeno in 17 biopsie di carcinomi squamosi vulvari (basaloidei, bowenoidi, cheratinizzanti) e 28 VIN (I, II, III di tipo differenziato ed indifferenziato) per stabilire la diversa eziologia dei carcinomi squamocellulari della donna giovane e della donna anziana. Dei 21 VIN indifferenziati

(basaloidi/bowenoidi), 10 sono risultati positivi al DNA di HPV con una netta prevalenza del genotipo 16 (9/10). Il carcinoma squamocellulare infiltrante bowenoidi è risultato positivo al DNA di HPV 35. I 7 VIN di tipo differenziato e i 16 carcinomi infiltranti cheratinizzanti sono risultati negativi.

I nostri dati quindi confermano la stretta associazione tra infezione da HPV ed alcuni tipi istologici di carcinomi squamosi e VIN indifferenziati riscontrabili nella donna giovane. Inoltre l'assenza di DNA di HPV nei VIN differenziati e nei carcinomi infiltranti cheratinizzanti della donna anziana supportano la diversa eziologia dei carcinomi della vulva: eziologia virale HPV correlata per i carcinomi squamosi basaloidi e bowenoidi ed eziologia non virale per i carcinomi cheratinizzanti.

G023

VALUTAZIONE ANALITICA DI UN SAGGIO DI REAL TIME PCR PER IL MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE DA VIRUS DI EPSTEIN BARR

Bortolin M.T., Tedeschi R., Zanussi S., Pratesi C., Bidoli E.*, De Paoli P.

U.O. di Microbiologia, Immunologia e Virologia e *Epidemiologia, Centro di Riferimento Oncologico, Istituto Nazionale Tumori-IRCCS, via Pedemontana Occidentale, 12, 33081 Aviano (Pordenone)

Introduzione e scopo. La valutazione quantitativa della viremia EBV è utile per monitorare pazienti a rischio di riattivazione virale. Scopo dello studio è stato approfondire la performance analitica di un saggio Real Time PCR per il dosaggio di EBV e confrontare tale metodo con uno non cinetico.

Materiali e metodi. Il sistema Real Time PCR (ABI PRISM 7900-Applied Biosystem) utilizza una sonda TaqMan che amplifica un frammento di 65 pb del gene LMP-1. La curva standard è stata costruita su diluizioni seriali di DNA di cellule Namalwa (range: 4×10^3 - 4×10^6 copie EBV/ml). Campioni corrispondenti a 2.5-5-10 copie in 8 repliche e campioni nel range 2.5-2 $\times 10^6$ copie in 6 repliche sono stati utilizzati per valutare rispettivamente sensibilità e riproducibilità. Sono stati poi dosati 5 campioni di pazienti con mononucleosi infettiva e 2 di carcinoma indifferenziato del nasofaringe, precedentemente dosati con un metodo non cinetico di PCR (Pratesi et al., J Clin Virol, in press).

Risultati. La sensibilità è stata del 100% a 10 copie, dell'83% a 5 copie e del 67% a 2.5 copie. I risultati sulla riproducibilità sono stati riportati in tabella:

Copie EBV	Riproducibilità			
	Intra-assay		Interassay	
	% CV	Media	% CV	Media
2.5	37.6	6.9	*	*
5	60.7	13.2	69.4	9.6
20	40.9	26.9	60.6	22.7
200	6.2	188.2	14.1	176.6
2000	7.1	1939.3	1.3	2119.7
20000	0.1	25363.6	0.7	24398.1
200000	5.2	246163.3	2.4	226534.9
2000000	5.6	2583915.0	8.7	2415883.0

Correlazione di Spearman ($p < 0.01$)

Valori di viremia più elevati (1173-46328 copie/ml) sono stati riscontrati rispetto al dosaggio precedente (450-5000 copie EBV/ml).

Conclusioni. La metodica Real Time PCR è molto sensibile, riproducibile e consente di processare numerosi campioni in tempi contenuti e con minore laboriosità rispetto alla PCR ordinaria. Queste caratteristiche analitiche e l'eliminazione delle procedure post-PCR, la rendono di facile applicazione e supportano la sua utilità nella valutazione del carico virale per monitorare pazienti che sono a rischio di riattivazione di EBV.

G024

CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA DI HIV-1 ISOLATO DURANTE UN'INFEZIONE PRIMARIA ASSOCIATA AD UNA SINDROME EMOFAGOCITICA SEVERA

Castillette C., Capobianchi M.R.*, Carletti F., Calcaterra, S., Preziosi R., Bernardini G#, Perno C.F., Armignacco O#.

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani", Roma
#Divisione Malattie Infettive, Ospedale Generale Belcolle, Viterbo

L'infezione primaria sintomatica da HIV è accompagnata da una più rapida progressione clinica della malattia rispetto all'infezione asintomatica.

Abbiamo voluto caratterizzare biologicamente un isolato virale proveniente da un soggetto con una sindrome emofagocitica severa in infezione primaria da HIV-1, comparando le proprietà del virus trasmesso con quelle del virus del donatore.

L'esame obiettivo di un ventisettenne, ricoverato in Ospedale per febbre elevata e cefalea, evidenziava condizioni generali compromesse, esantema maculo-papuloso diffuso, linfoadenomegalia, epatosplenomegalia; L'indagine epidemiologica non riferiva fattori di rischio per HIV e la ricerca degli anticorpi anti-HIV risultava negativa. Una biopsia linfonodale mostrava una corticale ridotta con rari follicoli, marcata proliferazione di istiociti con frequenti segni di eritrofagocitosi. Dopo 4 giorni compariva candidosi orale; l'antigene HIV p24 risultava positivo, la viremia molto elevata. E' stata diagnosticata sindrome emofagocitica in paziente con infezione acuta da HIV ed intrapresa terapia antiretrovirale. A 5 giorni dall'inizio della HAART, la sintomatologia d'esordio regredì, e nei tre mesi successivi la viremia si azzerava.

E' stata individuata la fonte dell'infezione ed isolato il virus dal plasma e dai linfonociti sia del donatore che del ricevente mediante co-cultura di PBMC privati dei CD8+.

Le caratteristiche biologiche dei virus isolati sono risultate indistinguibili sia per l'efficienza di replicazione (dosaggio della p24 nel sovrantante), che per l'utilizzo del corecettore (CCR5) determinato mediante infezione di cellule U87-CD4 esprimenti CCR5 o CXCR4.

Su entrambi gli isolati è stato dimostrato il polimorfismo I93L del gene della proteasi.

L'analisi molecolare condotta sulla regione del V3 mediante clonaggio e successiva analisi filogenetica ottenuta analizzando le correlazioni intra- ed inter-paziente mediante albero filogenetico "neighbour-joining program" ha dimostrato, nel donatore, la presenza di quasispecie altamente divergenti, mentre, nel ricevente una quasispecie virtualmente omogenea, fenomeno frequentemente dimostrato durante le fasi precoci dell'infezione da HIV, probabilmente dovuto ad una trasmissione a "collo di bottiglia".

La popolazione uniforme presente nel ricevente corrispondeva ad una popolazione minore delle quasispecie del donatore.

Le proprietà biologiche del virus isolato, insieme alla sequenza aminoacidica della regione del V3 (fenotipo M-

R5), non spiegano l'aggressività del decorso dell'infezione, che è stata prontamente controllata dalla terapia antiretrovirale.

G025

VALUTAZIONE DI 500 SIERI POSITIVI A BASSO TITOLO PER HCV-Ab CON METODO AUTOMATICO IN CHEMILUMINESCENZA

Cecchini F., Gagetta M., Mauri A., Turrini D., Guagnellini E.

Laboratorio di Biochimica Clinica e Microbiologia,
Azienda Ospedaliera San Paolo, Milano.

Scopo di questo lavoro è di verificare, per intervalli predefiniti, l'accuratezza dei risultati del test antiHCV eseguiti sul sistema ORTHO Vitros ECi (test di screening) verso il metodo LIA - InnoGenetic (test di conferma) e di definire le procedure operative da adottare al riscontro di sieri antiHCV analiticamente critici. I dati riportati sono riferiti al periodo Febbraio 2001 - Febbraio 2003. In questo periodo sono stati eseguiti 20860 test antiHCV su ECi (cut off dichiarato ≥ 1) e tutti i campioni che hanno dato un risultato compreso tra 0.8 - 20, sono stati ritestati con metodo LIA. Di tutti i campioni eseguiti nell'arco del periodo indicato, ben 509 sono stati i campioni confermati con LIA mentre i restanti 20351 non sono stati rianalizzati in quanto non cadevano nell'intervallo da noi scelto. Per meglio valutare l'accuratezza dei risultati di ECi, l'intervallo 0.8 - 20 è stato suddiviso in tre classi: 0.8 - 5; 5 - 10; 10 - 20. Per la prima classe sono stati ritestati 254 campioni che hanno dato i seguenti risultati in LIA: 117 negativi, 96 indeterminati, 41 positivi. Per la seconda classe sono stati testati con metodo LIA 102 campioni che si sono così distribuiti: 57 positivi, 34 indeterminati, 11 negativi. Infine per l'ultima classe, 153 sono stati i campioni ritestati di cui 136 si sono confermati positivi, 7 negativi e 10 indeterminati. L'analisi del χ^2 ha rilevato una differenza statisticamente significativa tra i due metodi ($p = 0.001$) per le prime due classi (0.8 - 5 e 5 - 10). Tale differenza potrebbe essere legata alla diversa sensibilità/specificità tra test di screening (ECi) e test di conferma (LIA). Alla luce dei risultati ottenuti, riteniamo necessaria l'esecuzione di un test di conferma per tutti quei campioni che cadono nell'intervallo 0.8 - 10.

G026

CANCRO DEL POLMONE ED INFEZIONE DA HPV

Ciotti Marco¹, Paba Piepaolo¹, Ambrogio Vincenzo², Benedetto Arrigo¹, Mineo TC², Cartesio Favalli¹.

Università di Roma Tor Vergata, Policlinico Universitario

¹ Laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica,

² Dipartimento di Chirurgia Toracica Viale Oxford, 81 00133 Roma

Il tumore al polmone è la principale morte per cancro nei paesi occidentali. Il fumo di sigaretta e l'inquinamento ambientale sono considerati i più importanti fattori di rischio nello sviluppo del cancro polmonare anche se non possono spiegare la totalità dei decessi. Quindi altre cause, oltre quelle chimiche, sono implicate nella cancerogenesi polmonare. Venti pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) sottoposti ad intervento chirurgico presso il

Dipartimento di Chirurgia Toracica del Policlinico Universitario Tor Vergata sono stati arruolati nello studio. I tumori sono stati classificati secondo il sistema TNM ed erano tutti allo stadio 1A. L'istologia tumorale era la seguente: 11 carcinomi squamosi, 6 adenocarcinomi e 3 carcinomi a grandi cellule. Mediante metodiche molecolari (PCR e Ibridazione inversa) abbiamo ricercato il virus del Papilloma umano (HPV) nelle sezioni tumorali fissate in paraffina dei suddetti casi. Tessuto polmonare sano è stato incluso come controllo. Le nostre indagini hanno mostrato la presenza del virus in 9 casi su 20 (45%) e in tutti i casi positivi, tranne uno, erano presenti da tre a cinque genotipi contemporaneamente (16,18,31,45,66 e 68). La presenza del virus non era correlata al tipo istologico del tumore anche se i soggetti con carcinoma squamoso hanno presentato una riduzione della sopravvivenza rispetto a quelli con adenocarcinoma e carcinoma a grandi cellule. Questi dati preliminari suggeriscono che l'HPV può avere un ruolo nella cancerogenesi polmonare.

G027

ANALISI DELLO STATO FISICO DEL DNA DI HPV16 IN LESIONI CERVICALI DI ALTO GRADO MEDIANTE UN SAGGIO DI REAL TIME PCR

Cricca M., Venturoli S., Bonvicini F., Ambretti S., Gallinella G., Manaresi E., Gentilomi G., Musiani M., Zerbini M.

Dipartimento di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale,
Sez. di Microbiologia, Università di Bologna,
Via Massarenti 9, 40138 Bologna

L'integrazione del DNA di HPV nel genoma umano è un evento importante nella progressione delle lesioni preneoplastiche a carcinoma cervicale invasivo. Il passaggio dalla forma episomiale a quella integrata comporta più frequentemente la distruzione o delezione delle ORF E2 ed E1; tali eventi determinano una sovraespressione delle oncoproteine E6 ed E7 responsabili della trasformazione maligna. Per analizzare, in lesioni preneoplastiche, la presenza di DNA di HPV 16 allo stato episomiale, misto e integrato sono stati allestiti saggi di PCR classica e di PCR real time. Per lo studio sono stati analizzati campioni citologici esocervicali provenienti da 10 pazienti, con CIN di alto grado e carcinoma microinvasivo, sottoposte a follow up postconizzazione.

Il DNA estratto dai campioni è stato sottoposto ad una prima analisi, mediante un saggio di PCR classica, che prevede l'amplificazione totale delle ORF E2 ed E6 allo scopo di discriminare le forme integrate da quelle miste ed episomiali. Successivamente i campioni sono stati analizzati mediante un saggio di PCR real time.

Per l'allestimento del saggio di PCR real time in formato SYBR Green sono state selezionate delle coppie di primer specifiche per E2 ed E6 in grado di amplificare frammenti di 150-300 paia di basi. Mentre la quantificazione di E6 permette di determinare la carica virale, la quantificazione relativa dell'E2 rispetto all'E6 fornisce il dato sullo stato fisico del DNA di HPV16: misto o episomiale.

Delle 10 pazienti analizzate il 20% mostravano l'HPV16 allo stato episomiale (2 CINIII), il 60% allo stato misto (5 CINIII e 1 carcinoma microinvasivo) e il 20% allo stato integrato (1 CINIII e 1 carcinoma microinvasivo).

L'applicazione clinica della tecnica di PCR real time, sia per lo studio dello stato fisico del DNA di HPV16 sia per la determinazione quantitativa del carico virale, risulta essere un valido strumento per valutare la prognosi in pazienti con infezione persistente da HPV 16 e lesioni di alto grado.

G028

INFEZIONE CRONICA DA VIRUS EPATITICI E DA HIV IN UNA POPOLAZIONE DI IMMIGRATI IN CAMPANIA

Cuniato V.^{1,2}, Bellitti F.^{1,2}, D'Isanto R.^{1,2}, Di Martino M.², Nocera E.², Bozzelli L.², Rea M.², Stornaiuolo G.³, Precone DF.³, Gaeta GB.³

Laboratorio di Microbiologia, Ospedale SM delle Grazie, Pozzuoli, Napoli¹. Centro Medico-Sociale J. E. Masslo, Castelvoturno, Caserta². Dipartimento di Malattie Infettive, Seconda Università di Napoli³

La valutazione dello stato di salute della popolazione immigrata è spesso ostacolata dalla mancanza di un sistema unico di sorveglianza nazionale e dalla presenza di una quota rilevante di immigrati clandestini, che usualmente non accedono al Servizio Sanitario.

Nel presente studio è stata rilevata la prevalenza di infezioni croniche da virus epatitici e da HIV in immigrati, prevalentemente clandestini, afferenti al Centro di Volontariato *Jerry Essan Masslo*. Per ogni paziente veniva compilata una scheda contenente informazioni demografiche e abitudini di vita e praticato un prelievo ematico per la determinazione di HBsAg, anti-HBs, anti-HBc, HBeAg, anti-HBe, anti-HDV, anti-HCV, anti-HIV.

Sono stati esaminati 544 soggetti: 260 femmine (200 prostitute e 60 ex-prostitute) e 284 maschi (210 disoccupati o con attività saltuarie, 68 manovali e 6 impiegati), provenienti prevalentemente dall'Africa sub-sahariana (81.6%); età mediana 28 anni (range 15-59).

HBsAg positività era presente nel 6.8% dei casi (nessuno era anti-HDV positivo); anticorpi anti-HCV erano rilevabili nel 3.4% dei soggetti esaminati; anti-HIV erano presenti nel 6.%; tra questi ultimi, 5 presentavano coinfezione HIV/HBV, mentre nessuno era coinfecto con HCV. Nessuno dei soggetti portatori di HBsAg presentava positività per HBeAg; tra tutti i soggetti esaminati, circa 1/3 presentava immunità anti-HBs.

L'infezione cronica da HBV era più frequente nei maschi ($p < 0.05$) mentre quella da HIV era più frequente nelle femmine e fortemente associata alla prostituzione. L'infezione da HCV era più frequente nei soggetti originari dell'Europa Orientale, mentre quelle da HBV e da HIV erano fortemente associate alla provenienza dall'Africa sub-sahariana. La percentuale di soggetti con anti-HCV e la loro distribuzione per età non è dissimile a quella riscontrata nella popolazione italiana. Elevata appare la percentuale di soggetti portatori di HBsAg; in associazione alla bassa copertura anticorpale riscontrata nella popolazione esaminata, il dato suggerisce la necessità di offrire una copertura vaccinale ai soggetti immigrati.

G029

DETERMINAZIONE DELLA FARMACO-RESISTENZA DI HIV-1 MEDIANTE ANALISI GENOTIPICA: CONFRONTO SULLA PREDITTIVITÀ DEI SAGGI INTERPRETATIVI VIROSEQ™ HIV-1 (APPLIED BIOSYSTEM), HIV-SEQ (STANFORD) E VIRTUAL PHENOTYPE (VIRCONET™).

Di Nicuolo G.; Chirianni A.*; Battisti S.; Starace M.; Sangiovanni V.*; Glielmi G.*

Servizio di Virologia, *3a Divisione di Malattie Infettive, A. O. "D. Cotugno", Napoli

Obiettivo: I ceppi HIV-1 farmaco-resistenti possono essere identificati mediante analisi genotipica. La predizione di farmaco-resistenza sulla base del sequenziamento del gene *pol* di HIV, tuttavia, richiede l'uso di programmi interpretativi sviluppati da esperti. Nel presente studio vengono confrontati i risultati ottenuti con tre diversi saggi interpretativi dei dati genotipici.

Materiali e metodi

Sono stati inclusi nello studio 34 sequenze genotipiche di HIV-1 ottenute da campioni di plasma di pazienti sotto terapia antiretrovirale e in fallimento virologico con carica virale > 1000 copie di HIV-RNA/mL. La sequenza del gene *pol* di HIV-1 è stata determinata con kit ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Applied Biosystem) secondo le procedure raccomandate. L'elettroforesi in gel di poliacrilamide è stata effettuata con ABI Prism 377 DNA Sequencer. L'analisi delle sequenze è stata effettuata con DNA Sequencing Analysis software, version 3.4 e ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System software, version 2.5, che fornisce anche un report interpretativo delle mutazioni rilevate che costituiscono evidenza genetica di farmaco-resistenza. Le sequenze ottenute sono state sottoposte anche ai saggi interpretativi di predittività di farmaco-resistenza Stanford HIV-SEQ (<http://hivdb.stanford.edu>) e Virtual Phenotype (VircoNET™). I tre saggi interpretativi sono stati confrontati sulla predittività di farmaco-resistenza per 15 farmaci: 6 NRTI (AZT, 3TC, DDI, DDC, D4T, ABC), 3 NNRTI (NVP, DLV, EFV) e 6 PI (IDV, RTV, NFV, SQV, APV, LPV). Sono stati considerati discordanti, per un determinato farmaco, i risultati forniti come predittivi di sensibilità da un saggio interpretativo e di resistenza da un altro.

Risultati

ViroSeq™ (VS), Stanford HIV-SEQ (SHS) e Virtual Phenotype (VP) hanno fornito rispettivamente 510, 510 e 470 interpretazioni. Risultati concordanti sono stati ottenuti nel confronto VS vs. SHS, VS vs. VP e SHS vs. VP, rispettivamente in 370/510 casi (72.54%), 291/470 (61.91%) e in 318/470 (67.65%). Risultati discordanti sono stati ottenuti in 26 casi (5.53%) nel confronto VS vs. VP, in 60 casi (12.76%) nel confronto SHS vs. VP e in nessun caso nel confronto VS vs. SHS. I risultati discordanti erano associati in tutti i casi con VP sensibile e furono ottenuti in modo significativamente più frequente con gli NRTI rispetto ai PI: 24/25 (96.0%) nel confronto VS vs. VP e 50/60 (83.33%) nel confronto SHS vs. VP. Nessun risultato discordante nel confronto fra i tre saggi interpretativi fu ottenuto per gli NNRTI. Dei 24 casi discordanti per gli NRTI osservati nel confronto VS vs. VP, 14 (58.33%) erano per DDC. L'analisi del pattern di mutazioni in questi soggetti mostrava la presenza della mutazione al codon 184 in 11/14 casi (78.57%). Dei 50 casi discordanti per gli NRTI osservati nel confronto SHS vs. VP, 12 (24.0%) erano per DDI, 12 (24.0%) per DDC, 11 (22.0%) per

D4T e 11 (22.0%) per ABA. L'analisi del pattern di mutazioni in questi soggetti non mostrava una mutazione chiave con un significativo valore predittivo di risultato discordante.

Conclusioni

In questo studio, il confronto fra tre saggi interpretativi di predittività di farmaco-resistenza di ceppi HIV-1 ha mostrato un alto grado di concordanza, specialmente per gli NNRTI e i PI. La predittività di resistenza a certi NRTI per una determinata sequenza di HIV-1 può essere contraddittoria e richiede ulteriori investigazioni.

G030

ANTI-HCV. CONFRONTO TRA SISTEMI IN AUTOMAZIONE. ANTI-HCV-ARCHITECT (ABBOTT) VERSO ANTI-HCV-VITROS (ORTHO).

Marinelli M., Tomassini L., Soldini L., Dorigatti F.

Diagnostica e Ricerca S. Raffaele, Via Stamina d'Ancona 20, Milano.

Obiettivo In questi ultimi anni diverse sono state le proposte da parte delle società diagnostiche di sistemi sempre più ricercati e completi per la rilevazione degli anticorpi contro il virus dell'epatite C. Nel nostro Istituto abbiamo avuto l'opportunità di confrontare una recente metodica completamente in automazione (Anti-HCV-Architect -ABBOTT-) con quella da noi in uso (Anti-HCV-Vitros-ORTHO).

Metodologia Lo studio è stato effettuato mediante: a) comparazione di 681 campioni non selezionati. I campioni reattivi a basso livello e/o discordanti sono stati analizzati ulteriormente con il test Chiron RIBA 3.0; b) analisi di 46 campioni con positività nota al test RIBA e 10 al test HCV-RNA; c) misurazione del pannello commerciale PHV 105 BBI costituito da 15 campioni a tipologia nota; d) analisi di 5 repliche per 5 giorni dei controlli positivo e negativo Anti-HCV-Abbott e di 3 campioni positivi a diversa concentrazione di analita.

Risultati Dei 737 campioni totali analizzati 644 sono risultati non reattivi, 88 reattivi con entrambi i metodi e 5 discordanti (test Chi Quadro non significativo, concordanza tra metodi 99.3%, sensibilità e specificità di Anti-HCV-Architect verso Vitros 98.9% e 99.4% rispettivamente). Dei 5 campioni discordanti, tutti con valore S/CO inferiore a 2, al test di conferma RIBA tre sono risultati indeterminati e due negativi; ciò a significare che il campione vero positivo, almeno in questo studio, non ha presentato problemi di individuazione per i due metodi. A ulteriore conferma vi sono i 46 e i 10 campioni positivi, rispettivamente al test RIBA ed HCV-RNA, che sono risultati reattivi con valori medi di S/CO di 12.7 e 13.0 per Anti-HCV-Architect e di 30.4 e 30.8 per Vitros. La riproducibilità dei risultati Anti-HCV-Architect è stata ottima con CV inferiori al 5%. I 15 campioni del pannello PHV-105 BBI sono stati classificati correttamente e con buona ripetibilità da entrambi i metodi (CV medio per Anti-HCV-Architect 3.5% e per Anti-HCV-Vitros 5%).

Conclusioni In conclusione possiamo affermare che il test Anti-HCV-Architect ha evidenziato caratteristiche analitiche del tutto confrontabili con il test Anti-HCV-Vitros. Tuttavia, se consideriamo che il sistema Architect (Abbott) è costituito da uno strumento modulare che può mettere insieme fino a quattro analizzatori ed ha una cadenza analitica di circa 180-200 test/ora per analizzatore (Vitros 60-70 test/ora) possiamo affermare che Architect (Abbott) rispetto a Vitros (Ortho) trova il suo migliore utilizzo in quei laboratori medio-grandi il cui punto di forza è, oltre alla qualità analitica, l'elevata cadenza unita a brevi tempi di risposta.

G031

ANTI-HBSAG-ARCHITECT VERSO ANTI-HBSAG-AXSYM. VARIABILITÀ ANALITICA. QUALI LE CAUSE.

Marinelli M., Tomassini L., Soldini L., Dorigatti F.

Diagnostica e Ricerca S. Raffaele, Via Stamina d'Ancona 20, Milano.

Obiettivo Comparare il dosaggio Anti-HBsAg-Architect (Abbott) con quello in uso in routine Anti-HBsAg-AxSYM (Abbott) ed indagare l'eventuale variabilità analitica.

Metodologia Lo studio è stato effettuato mediante: a) valutazione della riproducibilità dei risultati mediante analisi di tre controlli Anti-HBsAg (Abbott) e di tre campioni a diversi livelli di analita; b) analisi della linearità di risposta per entrambi gli analizzatori sia con procedura undiluted sia con quella in automazione (1:25 per Anti-HBsAg-AxSYM e 1:15 per Anti-HBsAg-Architect); c) comparazione di 103 soggetti, 59 maschi e 44 femmine, riuniti in tre gruppi: GR.1-immuni a seguito di vaccinazione; GR.2-immuni in forma naturale; GR.3-non immuni.

Risultati La riproducibilità dei risultati per Anti-HBsAg-Architect è stata ottima con CV inferiori al 5%. Altrettanto valida si è rivelata la risposta al test di linearità sia con la procedura undiluted ($r=0.998$, slope 0.95) che in diluizione automatica ($r=0.998$, slope 1.01) mentre per Anti-HBsAg-AxSYM si è ottenuto $r=0.972$, slope 0.87 e $r=0.994$, slope 1.17 rispettivamente. La comparazione tra i metodi ha evidenziato una pendenza della retta di regressione di 1.0 con un significativo coefficiente di regressione lineare (0.892). Lo studio della distribuzione delle differenze mostra un'ampia dispersione dei dati con una sovrastima media di circa 13% da parte di Anti-HBsAg-Architect. Tuttavia, se si confrontano i dati di GR.1 con GR.2, si nota che la variabilità maggiore è tra i soggetti immuni per acquisizione naturale e non tra gli immuni a seguito di vaccinazione; l'analisi delle differenze, infatti, rileva un valore medio di 0.1% per il GR.1 e di -53% per GR.2.

Conclusioni L'analisi dei dati ottenuti in questo studio, anche se su un campione non particolarmente numeroso, ci porta a sostenere che la variabilità misurata è, quasi sicuramente, dovuta all'eterogeneità tra individui nella risposta anticorpale ai diversi determinanti antigenici dell'HBsAg piuttosto che ad un problema di standardizzazione fra i metodi; infatti, le differenze tra metodi sono significative in chi ha acquisito e risolto in forma naturale la malattia rispetto a coloro che hanno acquisito l'immunità con un vaccino da ingegneria genetica sicuramente "antigenicamente" più omogeneo. In conclusione possiamo affermare che il test Anti-HBsAg Architect ha evidenziato caratteristiche analitiche del tutto confrontabili con il test Anti-HBsAg-AxSYM.

G032

INFEZIONE PRODUTTIVA "IN VITRO" DI BIOPSIE CERVICALI E RETTALI DA PARTE DI ISOLATI PRIMARI DI HIV-1 DI TIPO SYNCITIUM-INDUCING (SI) E NON SYNCITIUM-INDUCING (NSI)

Di Stefano M.*; Favia A.°; Lisco A.°; Caputi Iambrenghi O.‡; Fiore JR.° e Pastore G.

*Clinica delle Malattie Infettive, Università di Foggia. °Clinica delle Malattie Infettive, Università di Foggia, § Clinica Chirurgica, Dipartimento di Emergenza e Trapianto d'Organo, Università di Bari.

Introduzione: L'evidenza epidemiologica che i rapporti sessuali sono responsabili dell'80% delle infezioni da HIV-1 conferma che la maggior parte delle trasmissioni avviene a livello mucosale; a tale livello la distribuzione dei maggiori corecettori per HIV-1 (CCR5 e CXCR4) è un fattore rilevante. A tal proposito descriviamo un modello "in vitro" utilizzato per lo studio della trasmissione di isolati primari di HIV-1 con diverso fenotipo biologico (SI e NSI) a frammenti biotici di mucosa cervicale o rettale non polarizzati.

Materiali e metodi: Sei frammenti biotici da mucosa rettale o sigmoidale e da mucosa endocervicale sono stati prelevati da otto pazienti HIV-1 sieronegativi, e infettati con 1 ml di stock virale d'isolato primario NSI e SI pretrattati con DNase I e contenente 100-1000 TCID₅₀. I frammenti biotici sono stati mantenuti in coltura secondo due differenti protocolli: A) una coltura di frammento biotico per ogni paziente/virus è stata interrotta dopo 7 giorni, lavata e co-coltivata con PBMCs PHA-stimolati da donatore sano; successivamente i frammenti biotici sono stati rimossi e i PBMCs mantenuti in coltura per 21 giorni. B) una coltura biotica per ogni paziente/isolato virale è stata mantenuta in coltura per 7 giorni. La attività replicativa virale era valutata mediante ricerca della transcriptasi inversa nel sovrannatante di coltura.

Risultati e conclusioni: HIV-1 DNA provirale è stato evidenziato in tutte le biopsie endocervicali e rettili infettate sia con isolati di tipo SI che NSI; attività retrotranscrittasi è stata dimostrata in tutte le biopsie-culture sottoposte al protocollo di coltura B), solo dal 3 giorno dall'infezione, dimostrando l'assenza di carry-over dell'inoculo virale e la suscettibilità all'infezione di HIV-1 da parte delle biopsie cervicali e rettili. Inoltre, tutte le culture mantenute secondo il protocollo A hanno evidenziato la presenza di attività retrotranscrittasi dimostrando in tutti i casi il passaggio dell'infezione a PBMCs sani, e confermando la validità di questa metodica per lo studio dei meccanismi di trasmissione mucosale di HIV-1

G033

SHEDDING CERVICOVAGINALE DI HIV-1: CORRELATI CLINICI, IMMUNOLOGICI E TERAPEUTICI

Fiore JR.; ° Suligoi B.; § Di Stefano M.; * Lepera A.; Favia A.; Tateo M.; Lisco A.; Altini A.; Laddago V.; § Angarano G. e Pastore G.

Clinica di Malattie Infettive, Università di Bari, ° Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma, § Clinica di Malattie Infettive, Università di Foggia, * I Clinica Ginecologia e Ostetrica, Università di Bari, Italia.

Introduzione: La più diffusa modalità di trasmissione dell'

infezione da HIV-1 è quella eterosessuale; ad essa si aggiunge la trasmissione materno-fetale che rimane un'importante via di diffusione dell'infezione soprattutto nei paesi in via di sviluppo.

In entrambe i casi, la trasmissione del virus è dovuta al contatto diretto con il virus presente a livello del tratto genitale. La definizione dei livelli e dei fattori correlati allo shedding HIV-1 RNA nelle secrezioni cervico-vaginali ha importanti implicazioni nella definizione di strategie per la prevenzione dell'infezione da HIV.

Obiettivi: Valutare lo shedding di HIV-1 nelle secrezioni cervico-vaginali, i suoi correlati clinico-immunologici e gli effetti della terapia antiretrovirale, in un gruppo di donne infette senza evidenza di infezioni sessualmente trasmesse.

Metodi: Da 122 donne sono stati prelevati, campioni accoppiati di sangue periferico e lavaggi cervicovaginali (CVL). HIV-1 RNA è stato quantificato nel plasma e nella frazione acellulare dei CVL mediante NASBA (valore minimo rilevabile 80 copie/mL).

Risultati: Il 71% delle donne presentava una carica virale rilevabile in CVL, correlata alla carica virale plasmatica e al grado di immunodeficienza espresso dal numero assoluto di cellule CD4⁺. Le pazienti trattate con terapia antiretrovirale avevano un rischio minore di shedding del virus nel tratto genitale anche se tale associazione risultava limitata alle donne trattate con HAART. Inoltre, nel 25% di donne con carica virale plasmatica non rilevabile, è stato comunque dimostrato uno shedding genitale del virus.

Conclusioni: La carica virale plasmatica può non essere un indice affidabile dell'infettività delle secrezioni genitali. Inoltre, la terapia HAART sembra essere più efficace nella soppressione virale del livello di shedding genitale femminile che pertanto si conferma un compartimento distinto per la replicazione e l'evoluzione dell'HIV-1.

G034

LA QUANTIZZAZIONE DEL DNA DI HCMV MEDIANTE PCR COME INDICATORE DI PROGRESSIONE DELL'INFEZIONE NEL TRAPIANTO DI ORGANO SOLIDO

Franchi I., Zaccaria T., Barbui A., Varetto S., Giliberto G., Ghisetti V., Marchiaro G.

Dipartimento di Patologia Clinica, S.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista, Molinette, Torino.

L'infezione da Citomegalovirus (CMV) è una importante causa di morbidità nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido: marcatori di progressione dell'infezione per trattare precocemente pazienti ad alto rischio sono fondamentali. Lo scopo dello studio è stato di valutare la cinetica dell'infezione in pazienti sottoposti a trapianto, attraverso una analisi quantitativa di CMV DNA mediante Polymerase Chain Reaction (qPCR, Cobas Amplicor Monitor) in modo da identificare indicatori di progressione dell'infezione.

Metodi. CMV-DNA è stato quantizzato nei leucociti (PBL) da prelievi seriali di sangue in 47 pazienti sottoposti a controllo dell'infezione da CMV nei primi 6 mesi dopo il trapianto.

Risultati. Alla quarta settimana i pazienti che sono stati trattati circa 15 giorni dopo per la presenza di sintomi da CMV (n=30) avevano un viral load significativamente più alto di quelli asintomatici (4 log₁₀/1 milione di PBL vs. 2.8 log₁₀, p<0.0001). Un viral load >4 log₁₀/milione di PBL alla quarta settimana era associato ad un PPV di 100% e ad un

odds ratio di 45.37 per lo sviluppo successivo di malattia da CMV. Aumenti $> 1 \log_{10}$ dalla prima comparsa di CMV DNA alla quarta settimana erano associati a progressione clinica dell'infezione (odds ratio 1.74). Il valore soglia di CMV-DNA di $4 \log_{10}$ era particolarmente significativo per identificare nell'ambito dei pazienti R+/D- quelli che avrebbero sviluppato la malattia da CMV.

Conclusioni. L'infezione da CMV nel trapianto d'organo ha una dinamica molto rapida. Un $>4 \log_{10}$ di CMV-DNA alla quarta settimana dal trapianto è altamente predittivo di progressione dell'infezione, così come incrementi $> 1 \log_{10}$ dalla prima comparsa del DNA alla quarta settimana. Lo studio del viral load mediante qPCR consente di ottimizzare il trattamento precoce dell'infezione in pazienti ad alto rischio e assolve alle esigenze di standardizzazione di risultati di laboratorio per uso clinico

G035

IDENTIFICAZIONE DELLE DONNE IN GRAVIDANZA A RISCHIO DI TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS: RITROVAMENTO DI INDICI A BASSA AVIDITA' DELLE IGG IN COMBINAZIONE A PARTICOLARI PROFILI DI REATTIVITA' DELLE IGM VERSUS LA SIEROCONVERSIONE DELLE IGG.

Gabrielli L.¹, Lazzarotto T.¹, Simone M.¹, Grandi C.¹, Bellucci T.¹, Lanari M.², Venturi V.², Guerra B.³, Quarta S.³, Landini M.P.¹

¹U.O. di Microbiologia, Laboratorio di Virologia

²Istituto Clinico di Pediatria Preventiva e Neonatologia

³Clinica Ginecologica e Ostetrica e Medicina dell'Età Prenatale Policlinico S.Orsola-Malpighi, Università degli Studi di Bologna

Introduzione: l'infezione da Citomegalovirus (CMV) rappresenta la causa principale di infezioni congenite da virus con una percentuale, in Italia, dell'1,1% di tutti i nati vivi. La trasmissione materno-fetale dell'infezione è legata principalmente all'infezione materna primaria che presenta un rischio di trasmissione approssimativamente del 40%.

Scopo: confronto delle percentuali di feti/neonati con infezione congenita, con presenza di sintomi clinici alla nascita e con comparsa di sequele tardive nati da donne con infezione primaria da CMV diagnosticata in gravidanza sulla base o 1) del ritrovamento di indici a bassa avidità delle IgG in combinazione a particolari profili di reattività delle IgM o 2) di accertata sierconversione di anticorpi virus specifici.

Metodologia: tra il 1994 e il 2002, abbiamo saggiato 1309 campioni di siero provenienti da donne in gravidanza a rischio di trasmissione intrauterina di CMV. Nel circa 90% dei casi esse giunte alla nostra osservazione con un semplice sospetto di positività alle IgM. Presso il nostro laboratorio per ciascun campione abbiamo determinato l'indice di avidità delle IgG e studiato il profilo di reattività delle IgM anti-CMV mediante blot.

Risultati: in 71 casi abbiamo documentato la sierconversione delle IgG virus specifiche. Nei restanti 1238 campioni di siero ottenuti da gravide con un sospetto di risultato positivo alle IgM anti CMV, la positività non è stata confermata in 662 casi (53.5%). Fra le 576 donne con sospetta positività delle IgM abbiamo diagnosticato un'infezione primaria da CMV in 279 casi (48.4%), un'infezione non primaria in 241 (41.8%) casi ed infine un'infezione indefinita in 56 casi (9.8%). Fra le 71 donne con accertata sierconversione, 24 (33.8%) sono stati i feti/neonati infetti. Fra le 257 donne con infezione primaria diagnosticata sulla base della bassa avidità

delle IgG e positività delle IgM con il blot l'infezione fetoneonatale è stata accertata in 76 casi (29.6%). Risultati simili sono stati ottenuti sulla presenza dei sintomi clinici alla nascita (10% versus 12.8%) e sulla comparsa delle sequele tardive (7.0% versus 8.2%).

Conclusione: l'utilizzo combinato del blot e del test di avidità delle IgG eseguiti entro la 18a settimana di gestazione fornisce un valido strumento diagnostico in grado di identificare le donne a rischio di trasmissione intrauterina dell'infezione da CMV.

G036

L'INFEZIONE FETALE DA CITOMEGALOVIRUS.

Gabrielli L.¹, Lazzarotto T.¹, Magrini E.², Foschini M.P.², Simone M.¹, Bellucci T.¹, Eusebi V.², Landini M.P.¹

¹U.O. di Microbiologia, Laboratorio di Virologia,

Policlinico S.Orsola-Malpighi,

²Anatomia Patologica, Dipartimento di Oncologia,

Ospedale Bellaria, Università degli Studi di Bologna, Bologna

Introduzione: la trasmissione intrauterina dopo un'infezione materna primaria da Citomegalovirus (CMV) avviene nel 30-40% dei casi e il 10% dei neonati infettati sono sintomatici alla nascita. La diagnosi prenatale si propone di rilevare l'infezione in utero mediante il prelievo di liquido amniotico eseguito in 21° settimana di gestazione ed almeno 6-8 settimane dopo la sierconversione materna. Il liquido amniotico viene sottoposto a ricerca diretta del virus mediante isolamento culturale e del genoma virale mediante PCR.

Scopo: verificare l'infezione da CMV nelle placente e nei feti di 19 donne con infezione primaria avvenuta nel primo trimestre di gravidanza e con elevati carichi virali nel liquido amniotico.

Metodologia: la ricerca di CMV nelle placente e nei feti è stata effettuata 1) con l'ematossilina-eosina identificando le tipiche inclusioni intranucleari che conferiscono alla cellula infetta l'aspetto "ad occhio di civetta" e 2) con l'immunistochemical utilizzando un anticorpo monoclonale verso gli antigeni virali precoci. La doppia colorazione immunistochemical ha permesso inoltre di identificare il tipo di cellule infette grazie alla contemporanea ricerca degli antigeni virali e cellulari. Gli organi fetali esaminati sono stati: encefalo, polmone, cuore, rene, pancreas, milza, fegato. L'interruzione volontaria di gravidanza è stata eseguita in 22° settimana di gestazione.

Risultati: gli esami istologici hanno identificato cellule infette in tutte le placente esaminate. Le cellule placentali maggiormente interessate dall'infezione sono le cellule stromali. In tutti i feti almeno un organo è risultato infetto. Gli organi più frequentemente interessati dall'infezione sono il polmone ed il rene. La doppia colorazione immunistochemical ha evidenziato gli antigeni virali nelle cellule endoteliali, epiteliali, mesenchimali, nei neuroni, negli epatociti, ecc.

Conclusioni: nella trasmissione intrauterina da CMV un ruolo di fondamentale importanza è quello svolto dalla placenta a livello della quale il virus è in grado di replicarsi. Elevati carichi virali nel liquido amniotico sembrano essere sempre associati ad una compromissione fetale.

G037

LA RICERCA DI ANTICORPI ANTI-HCV CON DUE SISTEMI AUTOMATIZZATI

Piantino P., Sardella M., Martinasso G¹., Galli C.²

U.O.A. Microbiologia e ¹U.O.A. Chimica Clinica, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista, Corso Bramante 88, Torino;
²Medical Marketing, Abbott Divisione Diagnostici, via Mar della Cina 262, Roma

Scopo dello studio: confronto tra i test anti-HCV sui sistemi automatizzati Abbott Architect e Prism

Materiali e metodi: analisi in doppio del pannello anti-HCV a basso livello BBI PHV-105; valutazione su campioni consecutivi non selezionati della routine diagnostica e analisi dei reattivi con test supplementare (Inno-LIA HCV 3.0).

Risultati: i 15 campioni del pannello hanno fornito risultati in linea con l'atteso (reattività sui campioni positivi e indeterminati) con buona riproducibilità. Dei 749 campioni di routine, 742 (99,1%) hanno fornito un risultato concordante con i due sistemi (488 negativi e 254 reattivi). Nessuno dei sette discordanti (4 reattivi solo con Architect, 3 solo con Prism) ha evidenziato reattività al test supplementare. Dei 254 positivi concordanti 249 sono stati analizzati con Inno-LIA (11 negativi, 4 monoreattivi, 234 positivi). Il valore predittivo positivo era 90,7% con Architect e 91,0% con Prism. La distribuzione dei risultati negativi era analoga con i due sistemi (Architect S/CO 0,15±0,13, mediana 0,12; Prism S/CO 0,12±0,09, mediana 0,09). Il 99° percentile dei risultati negativi era 0,79 S/CO con Architect (praticamente coincidente con la zona grigia proposta di 0,80 S/CO) e di 0,48 con Prism. Il segnale Architect sui campioni reattivi correlava con la positività Inno-LIA: le percentuali di conferma erano 0% per S/CO <2 (9 campioni), 55% per S/CO 2-4,99 (20 campioni), 96,4% per S/CO 5-9,99 (28 campioni) e 100% per S/CO ≥10 (199 campioni).

Conclusioni: i test anti-HCV sui sistemi Architect e Prism hanno mostrato una sostanziale concordanza; tutti i campioni discordanti o non confermati al test supplementare presentavano una reattività a basso livello. In linea con quanto recentemente suggerito (MMWR 7-2-03), appare sostanzialmente inutile eseguire un test supplementare se la reattività è superiore a 5 S/CO (percentuale di "conferma" del 99,6%). La cadenza analitica di Architect (200 risultati/ora) è compatibile con una routine elevata come la nostra.

G038

DETERMINAZIONE DI ANTIGENE P24 E ANTICORPI ANTI-HIV 1/2 CON IL TEST AXSYM HIV COMBO

Grisendi L., Ferrari C., Galli C. I

Laboratorio di Microbiologia,
 Ospedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia;
¹Medical Marketing, Abbott Divisione Diagnostici,
 via Mar della Cina 262, Roma

Scopo dello studio: valutare le prestazioni analitiche in routine del nuovo test AxSYM HIV1/2 Combo (Abbott) per la determinazione combinata di antigene p24 e anticorpi anti-HIV1/2 in confronto con il test per soli anticorpi AxSYM HIV1/2gO.

Materiali e metodi: abbiamo analizzato in parallelo con i due test 550 campioni non selezionati della routine e 30 campioni

di sieroteca con risultato già noto con il test AxSYM gO. I campioni reattivi sono stati caratterizzati con Western blot.

Risultati: la concordanza tra i due test sui campioni di routine è stata del 99,45% (547/550; 540 negativi concordanti e 7 reattivi concordanti). I tre discordanti (2 reattivi gO e 1 reattivo Combo) erano negativi al WB, come pure uno dei positivi concordanti; la specificità dei due test era quindi 99,63% per Combo (l.c. 95% 98,7-100) e 99,45% per gO (l.c. 95% 98,4-99,9). Un campione in fase di sieroconversione (gp160 al WB) è stato identificato come reattivo da entrambi i test. Il test Combo è risultato reattivo sui 26 campioni positivi di sieroteca e ha dato esito negativo su 2 dei 4 falsi positivi. La distribuzione dei risultati negativi (S/CO) era analoga con i due sistemi (Combo: media 0,35±0,06, mediana 0,35, 11,7 d.s. dal cutoff; gO: media 0,37±0,06, mediana 0,36, 10,9 d.s. dal cutoff). Il 99° percentile dei risultati negativi era 0,63 S/CO con il Combo e 0,59 S/CO con il gO. I CV del Combo su 65 repliche dei controlli positivi (3 livelli) e negativo erano rispettivamente 11,16%, 11,47%, 6,83% e 7,36%.

Conclusioni: i due test hanno mostrato un'equivalenza quasi assoluta di risultati nella nostra routine diagnostica. Il test AxSYM Combo, del quale è già stata dimostrata la superiore sensibilità nelle prime fasi di infezione, si è rivelato leggermente più specifico e assai riproducibile, dimostrando quindi le caratteristiche analitiche essenziali per un impiego in routine.

G039

DONATORI HCV E HIV POSITIVI. INDAGINI SIEROLOGICHE SUPPLEMENTARI E RICERCA DEL GENOMA VIRALE A CONFRONTO.

Ghiazza P., Chiara M., Demarin G., Demarchi G., Gariglio V., Martinelli A., Trivè M., Massaro A.L.

Dip. G. Medicina Trasfusionale A.O. O.I.R.M. S. Anna Torino.

Scopo: Nel nostro Centro Trasfusionale (90000 donazioni/anno) è in uso dal 1998 il sistema ABBOTT PRISM Chlia per lo screening di HBsAg, HIV-Ab, HCV-Ab e dal 4/11/2001 la tecnologia Chiron TMA Procleix per la ricerca in minipool di HIV-1/HCV-RNA, in accordo con la DGR 28-3449 (9.07.01) della Regione Piemonte e in ottemperanza alla Circ. Min. N°17 del 30.10.2000 e la Circ. Min. N°14 del 12.12.2001. Dopo circa 18 mesi dall'introduzione in routine del test NAT, abbiamo analizzato l'espressione delle bande antigeniche dei campioni positivi al test supplementare RIBA Immunoblot Assay-ORTHO.

Metodi: Dal 4/11/2001 oltre 120000 unità di sangue sono state testate per lo screening anticorpale (ABBOTT PRISM) e la ricerca del genoma virale (Procleix HIV-1/HCV assay CHIRON) di HCV e di HIV-1. Ogni campione positivo (R>1) o border-line (G.Z. 20%) in PRISM viene ritestato, in duplicato sia in PRISM sia in AXSYM -ABBOTT- e, confermato mediante RIBA. Il test NAT viene eseguito su minipool da 8 campioni mediante TMA Multiplex Assay per la rivelazione contemporanea di HIV-1 e HCV-RNA. I campioni NAT positivi (NAT+), testati in singolo con lo stesso protocollo, sono analizzati separatamente per HCV o HIV mediante Discriminatory-test (Procleix HIV-1; Procleix HCV). Sui campioni ripetutamente reattivi (RR) per HCV-Ab e HIV-Ab in PRISM sono state condotte valutazioni comparative tra i 2 protocolli RIBA/TMA. Abbiamo analizzato: il n° di campioni RIBA POS/IND, il pattern delle bande antigeniche ed il relativo "score" in relazione alla distribuzione dei campioni con/senza viremia e al valore della ALT.

Risultati: su 120000 unità testate, 80 sono risultate RR per HCV-Ab e 57 per HIV1/2-Ab. Al test HCV-RIBA 42 donatori/80 sono stati confermati positivi e 30 erano anche viremici (71%), 20/80 hanno dato esito indeterminato (15% NAT+), 18/80 negativi RIBA/NAT. 24 campioni RIBA/NAT positivi con ALT elevate presentavano uno score di 4+ nel 100% dei casi per la c33 e la c22, nell'87% per la c100 e solo nel 50% dei casi per l'NS5. I campioni RIBA indeterminati/NAT positivi esprimono solo Ab anti-c33 o -c22, con score 4+/3+. Con un pattern di espressione sovrapponibile i campioni NAT negativi presentano score bassi (1+,2+). Dei 57 HIV-Ab RR solo 4 (7%) sono risultati RIBA positivi con viremia in atto e 1 RIBA indeterminato (17%).

Conclusioni: La percentuale di donatori confermati HCV-Ab positivi aviremici è pari al 30%. Un risultato indeterminato al RIBA correla con la presenza di HCV-RNA nel 15% dei casi. I campioni NAT+ con ALT elevate evidenziano un pattern di espressione di tutte le bande antigeniche con score elevati (3+,4+).

G040

VALUTAZIONE CONTINUA DELLA QUALITÀ DEL TEST NAT PROCLEIX HIV-1/HCV.

Ghiazza P., Chiara M., Demarin G.; Demarchi G., Gariglio V., Martinelli A., Trivè M., Massaro A.L.

Dip. G Medicina Trasfusionale A.O. OIRM S.Anna Torino.

Scopo: Il test NAT è in routine nel nostro Centro Trasfusionale dal 4/11/2001 (DGR 28-3449) con tecnologia singolo/minipool Chiron TMA Procleix Multiplex HIV-1/HCV Assay. Scopo di questo studio è individuare una procedura di controllo nel tempo di accuratezza e performance del metodo.

Metodi: Il nostro Centro raccoglie circa 90000 donazioni all'anno con un carico di lavoro giornaliero di 300-1000 unità. La tecnologia è validata in minipool da 8 campioni, che vengono allestiti da 2 TECAN Genesis RSP 150. Campioni in singolo e in minipool vengono testati su 2-3 run/giorno e distribuiti dal terzo TECAN Genesis secondo procedura Procleix HIV-1/HCV ASSAY (Chiron). Il sistema TMA-Procleix consiste in: 1 TCS (Target Capture System), 3 bagno-maria, 2 vortex, 1 Luminometro, 2 pipette Eppendorf. Con cadenza mensile abbiamo attuato un programma di Controllo Continuo della Qualità (CQC) per valutare la riproducibilità analitico-strumentale del test, che prevede sia misurazioni gravimetriche pre/post dispensazione di acqua distillata al posto di reagenti/plasma su TECAN-POOLING: 10 micropiastre e 120 provette pool; TECAN-TMA: 20 TTU (Ten Tube Unit); LUMINOMETRO: 20 TTU; TCS: 20 TTU; PIPETTE: 20 tubi con diversi volumi (25, 75, 100, 200, 250 microL); sia rilevamento della temperatura su sei punti: BAGNO-MARIA.

Risultati:

	TECAN-POOL		TECAN TMA		TCS	Luminom.
	Micro-piastre		Tubi-pool	TTU	TTU disp.	TTU asp.
N	10	120	20	20	20	20
media	228,3	microL	1,57	ml	9,092	ml 0,0013 3,902
Min	210	1,48	9,028	9,65	0,000	3,890
Max	232,2	1,62	9,114	10,187	0,009	3,978
v.a.	210	1,600	9,00	10,00	0,000	3,6-4,5
Acc.	+8,7%	-1,8%	+1%	+1%	+0,1%	(-3%)
SD	3	0,018	0,0219	0,120	0,002	0,018
CV %	1,56%	1,48%	0,2%	1,19%	/	0,47%

PIPETTE	75 microl		25 microl		100 microl	200 microl	250 microl
	1x	10x	1x	10x			
N	20	20	20	20	20	20	20
media	74,47	748	24,3	247	98,75	199,05	248,1
Min	73	739	24	241	97	196	247
Max	79	759	26	255	100	209	249
v.a.	75	750	25	250	100	200	250
Acc.	-0,7%	-0,2%	-1,2%	-1,2%	-1,2%	-0,5%	-0,7%
SD	1,46	3,8	0,57	2,8	0,71	2,45	0,44
CV %	1,97%	0,51%	2,3%	1,15%	0,73%	1,24%	0,18%

Conclusioni: Tutti gli strumenti mostrano nel tempo una buona precisione e accuratezza. Per il Tecan POOL (scostamento dal valore atteso -1,8%) si rende necessario un sistema di controllo gravimetrico e monitoraggio continuo gestito da un software dedicato. L'introduzione del programma CQC ci ha permesso di controllare a breve termine le performance del sistema e richiedere interventi mirati.

G041

DIAGNOSI DI LABORATORIO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO: DUE METODICHE A CONFRONTO.

Goffi M.B., Farris A.G., Satta G.
e.mail: fantoniogio@tiscalinet.it

Laboratorio Analisi Ospedale "R. Binaghi",
Via Is Guadazzonis 14, 09100 Cagliari

Il Citomegalovirus è un virus appartenente alla famiglia Herpesviridae, sottofamiglia Beta-Herpesvirinae, caratterizzato da un lungo ciclo replicativo ed è importante causa di mortalità nei soggetti immunodepressi.

L'infezione da Citomegalovirus o la riattivazione del virus stesso rappresenta quindi il rischio maggiore per il Paziente trapiantato che viene monitorato con indagini di Laboratorio che garantiscano una buona sensibilità.

Da circa quattro anni presso il nostro Laboratorio viene eseguita la determinazione del CMV-DNA su plasma dei Pazienti che hanno subito un trapianto di midollo osseo con metodica di amplificazione in PCR (CMV-Monitor - Roche diagnostics) ottenendo dei buoni risultati che, come già esposto in precedenti lavori, sono stati spesso d'aiuto al clinico nella scelta della terapia antivirale. Da circa un anno abbiamo affiancato a questo tipo di test anche la determinazione qualitativa dell'RNA messaggero per la proteina pp 67 del Citomegalovirus con metodica in amplificazione (Nuclisens CMV - Organon Teknica) test che secondo i dati della letteratura mostra delle ottime performances nei confronti dell'antigenemia pp65 in particolare per ciò che riguarda la sensibilità (CMV Nuclisens: sensibilità 97%; antigenemia pp65: sensibilità 63 %).

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare le caratteristiche del test a confronto con la metodica in uso presso il nostro Laboratorio (CMV-DNA Roche) con l'intento di stabilire se Nuclisens potesse essere di più valido aiuto nella diagnosi precoce dell'infezione da CMV.

Sono state eseguite 176 determinazioni contemporanee di CMV-DNA e mRNA pp67 su pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo di cui 151 sono risultati negativi con entrambe le metodiche, 11 campioni sono risultati concordemente positivi, 13 positivi per CMV-DNA e negativi per pp67, in un solo caso si è avuta la positività per pp67 e la negatività per CMV-DNA con una assorbanza abbastanza elevata (Tab. 1) Nella maggior parte dei 13 casi positivi per il CMV-DNA e

negativi per la pp67 si è potuto osservare che:

1. il test era positivo con un basso numero di copie per ml;
 2. la clinica confortava sempre il dato positivo del CMV-DNA.
- Alla luce di questi risultati ci sembra di poter concludere che il test CMV-DNA è più sensibile specialmente nella fase iniziale dell'infezione e che il test del mRNA pp67 non ci dà informazioni maggiori sull'andamento dell'infezione e pertanto si decide di abbandonare questa linea di lavoro anche in virtù di una valutazione costo-beneficio con cui il Laboratorio moderno si deve confrontare.

Tab. 1

		pp 67		
		+	-	T
CMV -DNA	+	11	13	24
	-	1	151	152
T		12	164	176

G042

UTILITÀ DEL TEST DI IGG AVIDITÀ NELLA DIAGNOSI DELLA MONONUCLEOSI INFETTIVA

Maiorano G., De Corato P., Bruno C., Abete O.,
Giampaglia A., Smeraglia R.

Servizio di Virologia Ospedale "Cardinale Ascalesi" ASL NA I -
Primario Prof. Riccardo Smeraglia

La diagnosi sierologica delle infezioni da virus di Epstein-Barr si basa sulla ricerca degli anticorpi IgG ed IgM diretti verso gli specifici componenti virali. Nella maggior parte dei casi il pattern anticorpale dell'EBV risulta sufficientemente efficace per inquadrare dal punto di vista diagnostico la fase della malattia o per escludere un'eventuale infezione in atto. Recentemente, sono stati messi in luce alcuni aspetti dell'infezione mononucleotica fino a poco tempo fa ancora poco conosciuti per l'inadeguatezza dei mezzi diagnostici a disposizione. Pertanto sono stati rivisitati e rivalutati alcuni casi che precedentemente rimanevano classificati come dubbi. L'utilizzo del test di avidità per le IgG anti EBV ha permesso di fornire utili indicazioni nei casi di infezioni croniche o riattivate, con persistenza di IgM, tardiva comparsa di anticorpi anti-EBNA, riattivazioni con comparsa di IgM di difficile interpretazione. Nel nostro laboratorio abbiamo utilizzato il test di chemiluminescenza (CLIA) della Dia-Sorin, con metodo automatizzato Liaison sia per la determinazione del profilo anticorpale che per la ricerca delle IgG avidità nei campioni di siero di pazienti con sospetta mononucleosi. Sono stati esaminati in totale 56 campioni di siero provenienti da pazienti classificati, in base al profilo anticorpale, come segue: 25 con probabile infezione acuta (VCA IgM presenti, EBNA IgG assenti), 26 con infezione pregressa (IgG anti VCA ed EBNA IgG presenti) e 5 casi con profilo indeterminato (assenza di EA IgG, VCA IgM ed EBNA IgG a basso titolo).

Il test per la ricerca delle IgG avidità è stato eseguito su tutti i campioni (56/56) considerando che una bassa avidità (<0,40) corrisponde ad un'infezione contratta entro il mese precedente. Dei 25 casi con sospetta infezione acuta l'84% (21/25) ha dato come risultato una bassa avidità, inferiore allo 0,40 mentre il 16% (4/25) presentava alta avidità.

Nell'81% dei campioni con infezione pregressa è stata riscontrata un'avidità alta (21/26) mentre nel 19% l'avidità è risultata bassa (5/26). L'avidità è risultata essere alta nel 60% dei casi con valori di EBNA IgG border line ed è risultata bassa nel restante 40%.

In conclusione dai risultati ottenuti si evince che per una

migliore definizione dell'infezione da EBV è utile integrare la diagnosi sierologica con l'impiego del test di IgG avidità in particolare nei casi con pattern anticorpale dubbio.

G043

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELL'EBV-DNA PLASMATICO E TEST DI IGG AVIDITÀ NELLA MONONUCLEOSI INFETTIVA

Maiorano G., De Corato P., Bruno C., Abete O.,
Scancariello G., Smeraglia R.

Servizio di Virologia Ospedale "Cardinale Ascalesi" ASL NA I -
Primario Prof. Riccardo Smeraglia

L'analisi del profilo anticorpale dell'EBV, nella routine di laboratorio, permette di rilevare la presenza nel siero di immunoglobuline di classe IgG ed IgM dirette verso i principali antigeni dell'EBV: VCA- EA- ed EBNA, ma non sempre fornisce indicazioni utili alla diagnosi di mononucleosi infettiva, a causa della eterogeneità e complessità della risposta stessa legata a fattori spesso condizionati dalla soggettività della risposta immunitaria (tempi di risposta non convenzionali, persistenza di IgM, tardiva comparsa di anticorpi anti-EBNA, riattivazioni con comparsa di IgM, etc.). Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare l'utilità della PCR quantitativa (qPCR) per la ricerca del genoma di EBV nel sangue, in associazione al test di avidità anticorpale nel siero per confermare o escludere il sospetto di mononucleosi infettiva in pazienti con profilo sierologico dubbio. La diagnosi sierologica viene effettuata nel nostro laboratorio con il metodo di chemiluminescenza (CLIA) LIAISON della ditta DIA-SORIN. In un periodo di 7 mesi sono stati esaminati 661 campioni per un totale di 2600 determinazioni, provenienti da pazienti con sospetta mononucleosi. IL 60,5% (pari a 400 campioni) erano infezioni pregresse, il 24% (pari a 158 campioni) sono risultate negative per assenza di anticorpi anti EBV, il 7,4% (pari a 49 campioni) infezioni riattivate e 54 pari all'8,1% infezioni acute. In particolare 20 campioni che allo screening sierologico erano risultati VCA IgM positivi sono stati ulteriormente studiati, approfondendo la diagnosi con il test di PCR DNA quantitativo (AMPLIMEDICAL) e il test IgG avidità (DIA-SORIN). Tutti i campioni esaminati provenivano da pazienti con sintomatologia acuta compatibile con infezione primaria da EBV. Il primo gruppo 15/20 campioni era costituito da pazienti con assetto sierologico dubbio (positività contemporanea di IgG e IgM anti VCA e IgG anti EBNA, o positività solo per IgM anti VCA, o valori border-line). Il secondo gruppo di campioni 5/20 era costituito da pazienti con profilo sierologico di infezione acuta (VCA IgG e IgM ed EA positivi ed EBNA assenti). Il test di EBV DNA PCR quantitativo è stato eseguito su tutti i pazienti (20/20). Nel primo gruppo il test di EBV DNA PCR quantitativo è risultato negativo in 14/15 pazienti e positivo in 1 paziente che presentava allo screening di base la sola presenza di IgM anti VCA ad alto titolo. Dei 5/20 campioni in fase acuta 4/5 erano positivi al test PCR quantitativo, 1/5 pazienti è risultato negativo, ma con un test di avidità delle IgG bassa.

G044

VALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DI INFEZIONE DA PATOGENI A TRASMISSIONE SESSUALE E PARENTERALE IN UN GRUPPO DI SOGGETTI AD ALTO RISCHIO NON SOTTOPOSTI IN PRECEDENZA AD ALCUNO SCREENING SPECIFICO PRESSO STRUTTURE DEL S.S.N.

Baldassarre C.*, Giovannetti G.A., Zevino C., Sorrettone E.**, Allegretti de Lista G., Crea A., Mazzella A.

Laboratorio di Patologia Clinica e Microbiologia D.S. 47 - A.S.L. Napoli I

* Dipartimento Farmacodipendenze A.S.L. Napoli I

** U.O. Se.R.T. D.S. 45 - A.S.L. Napoli I

Si presentano i risultati preliminari selezionati nell'ambito di uno studio più ampio, finanziato dall'I.S.S., sui principali patogeni a trasmissione sessuale e parenterale in soggetti a comportamenti a rischio non afferenti ai servizi di assistenza sia pubblici che privati. Nostro obiettivo è stato considerare la prevalenza di queste infezioni in un "sommerso" importante per la valutazione di prevalenza e incidenza nella popolazione generale dell'area metropolitana di Napoli e hinterland casertano.

Materiali e metodi: la fase operativa dello studio è iniziata a luglio 2002 ed è terminata nel febbraio 2003. Sono stati contattati per strada n. 673 soggetti con comportamenti ad alto rischio: in 253 casi è stato possibile effettuare "sul territorio", con l'ausilio di una unità mobile attrezzata, prelievi ematici per lo screening delle seguenti infezioni: HIV, HBV, HCV, Lue.

La ricerca degli anticorpi anti HIV è stata eseguita con il test combinato HIVAg p24/ HIVAb della ditta Roche, i sieropositivi sono stati confermati con metodo W.B. (ditta Biorad), gli anticorpi anti HCV, HBV e l'antigene HBs sono stati determinati con il test ELISA (ditta Roche), i tests di conferma HCV con il metodo RIBA della ditta Ortho, la VDRL è stata eseguita con metodo RPR (ditta Biomérieux).

Risultati: i soggetti esaminati sono stati divisi per età, sesso, nazionalità e categoria a rischio; i dati ottenuti sono stati correlati con quelli di soggetti a rischio sottoposti a monitoraggio diagnostico presso i Se.R.T. e gli ambulatori del S.S.N. I risultati confermano la bassa prevalenza degli infetti HIV nella città di Napoli e hinterland casertano in una popolazione ad alto rischio: infatti è stata riscontrata positività in 17 soggetti, pari ad una prevalenza del 6,7%. Tale prevalenza è comunque risultata tre volte superiore a quella dei servizi napoletani di screening e assistenza sanitaria a soggetti con comportamenti a rischio. Anche per l'infezione luetica si è riscontrata una prevalenza più elevata (9,1%): in particolare sono risultati positive donne che praticano la prostituzione. Al contrario la prevalenza dell'infezione all'HCV è stata riscontrata irrilevante (1,3%) nei soggetti con il solo fattore di rischio prostituzione e sale al 41,7% quando al rischio sessuale si aggiunge quello parenterale della T.D. Per l'epatite B nel campione esaminato la positività dell'HBsAg è stata riscontrata nel 7,1% e la presenza di anticorpi nel 40 % dei soggetti esaminati.

Conclusioni: i risultati della ricerca hanno permesso di conoscere uno "spaccato" di popolazione ad alto rischio di contagio per le infezioni sessualmente e parenteralmente trasmesse che non erano a conoscenza del loro stato sierologico. Riteniamo che l'offerta attiva di prelievi ematici per la ricerca dei patogeni succitati, nell'ambito di una attività svolta per "strada", può dare valide indicazioni circa la situazione

epidemiologica della popolazione a rischio che sfugge al monitoraggio dei servizi di assistenza sanitaria nazionale. Maggiori conoscenze in gruppi esposti a differenti fattori di rischio permette di dare una migliore stima della diffusione dell'infezione HIV e pertanto consente di programmare strategie più valide e utili a ridurre la trasmissione dell'infezione in particolare nella popolazione a rischio prevalentemente sessuale.

G045

PREVALENZA DI INFEZIONE DA NOROVIRUS NELL'AREA DI PARMA.

Medici M.C., Martinelli M., Abelli L.A., Arcangeletti M.C., Pinardi F., De Conto F., Valcavi P., Calderaro A., Dettori G. e Chezzi C.

Sezione di Microbiologia - Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio - Università degli Studi di Parma - Viale Antonio Gramsci, 14 - 43100 Parma.

I Norovirus, appartenenti alla famiglia *Caliciviridae* e precedentemente noti come "Norwalk-like virus" (NLV), costituiscono una delle principali cause di episodi epidemici e sporadici di gastroenterite acuta non-batterica sia nei bambini che negli adulti. La mancanza di sistemi cellulari *in vitro* e di modelli animali efficaci per la propagazione di NLV hanno compromesso lo studio di questi virus, fino alla recente introduzione di metodi molecolari basati sull'amplificazione dell'acido nucleico.

In questo studio è stata valutata la prevalenza di infezione da NLV su campioni di feci appartenenti a soggetti ricoverati od osservati ambulatorialmente presso l'Ospedale Maggiore di Parma nel corso dell'anno 2002 e sottoposti ad indagini virologiche mediante sia microscopia elettronica sia esame colturale convenzionale. Per la ricerca di NLV è stata utilizzata una reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione di tipo nested (nRT-PCR), da noi messa a punto, in grado di amplificare una regione del gene codificante per l'RNA polimerasi virale.

Dei 674 campioni di feci saggiati appartenenti a 623 pazienti prevalentemente pediatrici con gastroenterite acuta, 70 (10,4%) sono risultati positivi per NLV mediante nRT-PCR, in 9 casi associati a rotavirus, in 7 ad adenovirus ed in 4 a picornavirus-simili, rivelando una prevalenza complessiva di infezione dell'11,2% (70 su 623). Dei 70 ceppi di NLV rivelati, 45, sottoposti a RT-PCR "seminested" per l'identificazione del genogruppo di appartenenza, sono risultati positivi per genogruppo II.

Dei 70 pazienti con infezione da NLV, il 74,3% aveva un'età compresa tra 0 e 4 anni, il 18,6% tra 5 e 12 anni, il 4,3% maggiore di 12 anni (di due pazienti l'età non era disponibile). L'infezione, riscontrata in ogni mese dell'anno eccetto Giugno, ha rivelato una maggiore incidenza nel periodo autunno-inverno (84,3%: 59 su 70) con due picchi stagionali in Settembre e in Novembre.

Verranno discussi i dati epidemiologici relativi ai casi di infezione da NLV anche a confronto con quelli relativi agli altri agenti virali rivelati nella popolazione esaminata.

G046

**IPERPLASIA EPITELIALE FOCALE
(MALATTIA DI HECK):
DESCRIZIONE DI UN CASO**

Modolo M.L., * Zilli F., ° Marus W., ° Bortuzzo G.,
Martelli P., Moratto A., Villalta D., Cappelletti P.I

S. S. Immunologia Clinica e Virologia, * Servizio di Chirurgia
Maxillo-Facciale e Odontostomatologia, ° Servizio di Anatomia
Patologica, I Dip.to di Medicina di Laboratorio, A. O.
"S.Maria degli Angeli", Via Montereale 24, 33170 Pordenone

I papillomavirus umani (HPV) sono virus strettamente epiteliotropi, attualmente distinti in più di 120 genotipi dotati di diverso potere patogeno: singoli tipi sono infatti correlati a specifiche manifestazioni cliniche. I genotipi 13 e 32 sono associati pressochè esclusivamente a lesioni della mucosa orale e più precisamente a iperplasia epiteliale focale (FEH) o malattia di Heck. Si tratta di una rara infezione virale presente in tutto il mondo, ma più frequente tra gli Indiani degli Stati Uniti, dell' America Centrale e Meridionale, tra gli Esquimesi della Groenlandia e dell'Alaska, mentre nei Caucasicci sono stati riportati solo pochi casi (Syrjänen K. & Syrjänen S., 2000). In Italia un solo caso è descritto in letteratura (Ficarra G. et al., 1991).

Clinicamente l'iperplasia epiteliale focale si presenta con lesioni rilevate della mucosa orale, multiple, asintomatiche, tendenti alla diffusione, che possono essere confuse, anche istologicamente, con papillomi e/o condilomi. Anche nel caso da noi descritto si è posta questa difficoltà diagnostica, e solo il rilevamento di HPV13, eseguito mediante PCR (consensus primers - regione L1) e successiva tipizzazione (analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione-RFLP), ci ha permesso di formulare una diagnosi corretta.

Descrizione del caso

Giovane donna di 22 anni, albanese, coniugata, residente in Italia da circa 3 anni, HIV - negativa, giunta alla nostra osservazione per motivi odontoiatrici, che presentava alla prima visita singola neoformazione, di 3 mm diametro massimo, leggermente rilevata, rosea, non dolente, in corrispondenza della commissura labiale sinistra. Successivamente è intercorsa una gravidanza e la paziente alla seconda visita, circa un anno dopo, presentava numerose lesioni orali (> di 10), asintomatiche, bilaterali e talune confluenti. Sono stati eseguiti prelievi biotipici per l'esame istologico e per la ricerca di HPV-DNA, seguita da tipizzazione mediante analisi del polimorfismo di restrizione (RFLP) (secondo protocollo modificato, Bernard H-U et al., 1994).

Risultati

Il quadro istologico era caratterizzato da mucosa rivestita da epitelio squamoso pluristratificato iperplastico, paracheratico e acantotico, con papillomatosi del chorion, zonale fusione delle creste, angiectasie intrapapillari e zonale infiltrato linfocitario. I singoli elementi epiteliali, lungo tutto lo spessore, presentavano nuclei ovalari, monomorfi, senza evidenti atipie, talora apoptotici, circondati spesso da un alone chiaro e con citoplasma eosinofilo. Assenti le mitosi.

La ricerca di HPV-DNA ha rivelato la presenza di HPV13.

Conclusioni

Dalla nostra esperienza possiamo concludere che, in presenza di lesioni multiple, simil-condilomatose, localizzate esclusivamente a livello del cavo orale, in soggetti giovani, per una corretta diagnosi della malattia di Heck, oltre alla valutazione clinica e all'esame istologico, si rende necessaria anche e soprattutto l'indagine virologica molecolare.

G047

**VALUTAZIONE COMPARATIVA DI DUE TESTS
DI QUARTA GENERAZIONE PER LA DIAGNOSI
DI INFEZIONE DA HIV. DATI PRELIMINARI.**

Panza G., Coppola C., Romano N., Di Prisco G., Falco E.,
Scancariello G., Alterio A., Smeraglia R.

Virologia P.O."C.Ascalesi" A.S.L. NA1: Dir. Prof. R. Smeraglia -Napoli.

Introduzione

La crescente disponibilità di sistemi automatizzati nel campo delle indagini sierologiche ha semplificato notevolmente la gestione delle analisi di routine. La rapidità e la semplicità di esecuzione dei tests non possono però prescindere dalla attenta valutazione dei risultati delle indagini stesse. Questo discorso è particolarmente valido per gli esami i cui esiti hanno un enorme impatto sociale e sanitario, come nel caso della diagnosi sierologica delle infezioni da HIV.

Scopo del lavoro

Lo scopo del presente lavoro è di effettuare una comparazione tra 2 sistemi automatizzati (COBAS CORE HIV COMBI ROCHE e VIDAS HIV DUO bio-MERIEUX) di quarta generazione che consentono la rilevazione simultanea dell'antigene p24 e degli anticorpi totali anti-HIV1 (gruppi M ed O) e anti-HIV2.

Materiali e metodi

Abbiamo analizzato in parallelo n°480 campioni appartenenti a 4 diverse categorie di pazienti: n°280 tossicodipendenti dei S.e.r.t. e del Carcere di Poggioreale che afferiscono al nostro Servizio; n°55 campioni di stranieri temporaneamente presenti (S.T.P. legge 40 del 1998) che si rivolgono al nostro centro prelievi per esami di routine; n°120 pazienti dell'Ospedale Psichiatrico Giudiziario (O.P.G.) e n°25 donatori provenienti dal Centro Trasfusionale della nostra A.S.L. per la conferma di sieropositività. Per ciascun campione risultato reattivo e per i campioni risultati dubbi è stato eseguito il test Western Blot (NEW LAV BLOT HIV1).

Risultati

27/ 480 (5,6%) campioni analizzati sono risultati positivi: 18/280 (6,4%) utenti S.e.r.t.; 3/55 (5,45 %) S.T.P.; 5/120 (4,1%) O.P.G. e 1/25(4%) donatori. Tutti i 27 campioni risultati positivi concordano con i due tests, e tutti sono stati confermati con il test W.B. Dei rimanenti 453 sieri, 12 sono risultati dubbi (grey-zone): di questi, 9 sono risultati dubbi con il test ROCHE ma negativi al test VIDAS e negativi al Western Blot. 3 campioni risultati grey-zone con entrambi i tests sono risultati indeterminati al W.B. I rimanenti 441 campioni sono risultati negativi concordanti con i due tests.

Conclusioni

L'analisi dei dati evidenzia una sostanziale concordanza fra i due tests di 4° generazione per la diagnosi di infezione da HIV. Il follow-up dei campioni di pazienti risultati dubbi discordanti ci potrà chiarire se il risultato diverso deriva da una maggiore sensibilità del test ROCHE rispetto al test VIDAS o se trattasi semplicemente di falsi positivi.

G048

RASSEGNA DI EPISODI DI GASTROENTERITI ACUTE DA NORWALK LIKE VIRUS

Pecone L. F.; Vecchi E.; Righi E.

Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche e Statistiche, via Campi, 41100 Modena; tel. 059/2055456, e-mail lufloren@yahoo.it.

Norwalk like virus (NLV) resta la causa di epidemie di gastroenteriti acute con alta mortalità, morbosità e morbidità presenti in tutto il mondo.

Scopo

Scopo di questo lavoro è raggruppare i casi avvenuti negli anni 2000-2002 ed evidenziare graficamente la loro distribuzione temporo- spaziale nei diversi paesi del mondo, in modo tale da stimare la reale frequenza delle epidemie. Dalla letteratura internazionale emerge che la frequenza di epidemie in tutto il mondo risulta costante nel tempo e nello spazio, anche se le aree in cui questo microrganismo viene riscontrato sono geograficamente distanti. Gli isolamenti virali in laboratorio sono poco rapidi, i sintomi clinici si manifestano prima dell'isolamento, le indagini epidemiologiche sono frammentarie ed incomplete, risalire alla sorgente risulta difficile, la terapia e l'allestimento di vaccini sono ancora inesistenti: tutto ciò rende la prevenzione e la delimitazione della diffusione della malattia sempre poco efficaci. E' per questo che il supporto bibliografico aggiornato potrebbe risultare utile a scopo epidemiologico - preventivo. Spesso l'impossibilità di reperire informazioni sia cartacee che on-line, scritte nella lingua del paese in cui si è verificata l'epidemia (ad es. Giappone), rende difficile l'aggiornamento continuo del medico che si trova a far diagnosi sui pochi elementi a disposizione.

Metodologia

Le metodologie impiegate sono state WINSPIR e PUB-MED, con ricerca on-line.

Risultati

I risultati ottenuti, hanno dimostrato la frequenza di epidemie di gastroenterite acuta causata da NLV in varie zone del mondo; i dati sono riportati nelle tabelle riassuntive dei diversi episodi. Dalle tabelle emerge che le epidemie sono molto frequenti nei paesi del Sud Est asiatico, ed in quelli europei dell'Est ma sono colpite anche aree come la Nuova Zelanda ed il Golfo di Taranto, qui in Italia.

Conclusioni

Dal momento che l'adozione di misure preventive, seppur accurate, e la rapidità di trasmissione del virus nella comunità rendono praticamente difficile la prevenzione del contagio, un costante aggiornamento epidemiologico, la continua attenzione nell'adozione di misure igienico-profilattiche ed un isolamento laboratoristico più rapido potrebbero limitare la diffusione e diminuire l'incidenza di gastroenteriti da NLV.

G049

CASO DI MALATTIA FEBBRILE ASPECIFICA DA COXSACKIE A16 IN UN NEONATO

Mantovani G., Meacci M., Nanni N., Govi V., Calvo C., Meccugni B., Petocchi V., Murru G.

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Sezione di Virologia, Università di Modena e Reggio Emilia, Via del Pozzo 71, 41100 Modena

Introduzione. Diverse pubblicazioni riportano dati sul ruolo degli Enterovirus non polio come causa di ospedalizzazione di bambini piccoli nei quali provocano comunemente una sindrome febbrile aspecifica che può durare da 24 ore a più di una settimana. Il decorso della malattia può però essere grave se l'infezione avviene in neonati.

Caso clinico. Si riporta il caso di un neonato di 6 giorni la cui madre sviluppò manifestazioni eritematose da malattia mani, piedi e bocca negli ultimi 2 giorni di gravidanza. Il neonato venne ricoverato presso la clinica pediatrica di Modena per febbre (38° C) e leggera letargia. Le indagini di laboratorio misero in evidenza una leggera leucocitosi (12.5x10³ /mmc) e aumento della proteina C reattiva (3.22 mg/dl). La febbre scomparve dopo 3 giorni e in una settimana i parametri biochimici si normalizzarono.

Esami virologici. Isolamento virale: monostrati di cellule VERO e di fibroblasti umani (FU) furono inoculati con campioni di liquor e feci e controllati giornalmente per la comparsa di effetto citopatico (ECP).

Reazione polimerasica a catena (PCR): il genoma di Enterovirus fu ricercato in nested PCR utilizzando primers di consenso.

Identificazione dell' isolato virale: fu condotta mediante anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni di gruppo di Enterovirus e mediante nPCR con primers di consenso.

Tipizzazione dell'enterovirus isolato: fu condotta dapprima utilizzando tre pools di anticorpi monoclonali rispettivamente verso Echovirus 4,6,9,11,30,34, Enterovirus 70,71 e Cocksackievirus B 1,2,3,4,5,6 in reazioni di immunofluorescenza indiretta (IFI), successivamente furono utilizzati specifici primers verso Echo 71 e Cocksackie A16 (CA16) in nPCR.

Esami sierologici. 2 successivi campioni di sangue del neonato e della madre furono esaminati per la presenza di anticorpi anti IgM e anti IgG verso gli antigeni di gruppo di enterovirus mediante ELISA mentre anticorpi anti IgM e anti IgG verso antigeni tipo specifici per CA16 furono ricercati mediante IFI su colture cellulari infettate con CA16. Gli stessi sieri furono testati per la presenza di anticorpi neutralizzanti verso CA16.

Risultati e discussione. Un isolato virale ottenuto dalla inoculazione delle feci del neonato su colture di FU sottoposto a successive indagini virologiche dimostrarono dapprima la sua appartenenza al gruppo degli Enterovirus e poi lo identificarono come CA16. Malgrado il concorso di circostanze avverse quali la giovane età, l'assenza di anticorpi neutralizzanti, la presenza del genoma di Enterovirus nel liquor, l'infezione enterovirale si caratterizzò per un decorso mite. La sindrome febbrile aspecifica del neonato viene solitamente sospettata essere di origine batterica. La richiesta al laboratorio da parte dei clinici di indagini virologiche può evitare l'inutile protrarsi di una terapia antibatterica.

G050

**EMERGENZA SARS - L'ESPERIENZA DEL
LABORATORIO DI VIROLOGIA DELL'OSPEDALE
AMEDEO DI SAVOIA DI TORINO.**

Piro F.; Pistono P.G.; Milia M.G.; Resente P.; Granito M.T.;
Russo P.; Allegramente L.; Di Garbo A.

Laboratorio di Virologia
Ospedale Amedeo di Savoia di Torino (ASL 3)

La comparsa a Febbraio in Cina della Sindrome Acuta Respiratoria Severa (SARS) e la sua rapida diffusione mondiale ha costretto le strutture sanitarie preposte, ad approntare rapidamente, protocolli diagnostici adeguati a discriminare tale patologia da altre forme comuni di polmonite atipica. Tali procedure potranno subire modifiche nel tempo ma costituiscono fin d'ora un valido approccio adattabile ad altri tipi di emergenza.

I protocolli, desunti dalle indicazioni fornite dal WHO tramite Internet, prevedevano per ciascun paziente la raccolta di n.2+2 tamponi e n.2 lavaggi nasofaringei bilaterali, n.2 tamponi orofaringei, n.2 provette di sangue intero e con EDTA. Si redigeva una scheda paziente.

Successivamente erano eventualmente previsti espettorato, lavaggio broncoalveolare (BAL), aspirato tracheale o liquido pleurico, urine e feci.

I materiali in laboratorio venivano manipolati in camera sterile a sicurezza P3. Su tutti, eccetto il sangue, erano praticate colture a 37° con cellule Hep2, Vero, BGM, MRC, a 34° con cellule Vero, MRC, DOG per 21 giorni. Contemporaneamente si eseguiva (sangue incluso), una nested-PCR per *SARS-coronavirus*, *Influenza A /B* ed *Enterovirus*. Su siero erano ricercati Anticorpi Fissanti il Complemento per *Parainfluenza 1-2-3*, *Influenza A /B*, *Coxsackievirus A/B* ed *Echovirus*, IgG ed IgM anti RSV, *Adenovirus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Legionella pneumophila*. Ove possibile si eseguiva un prelievo tardivo. Ciascun materiale era stoccato per l'invio a centri di riferimento.

Risultati: I 6 pazienti esaminati, di età tra 18 e 56 anni, erano negativi a colture e ricerca dell'RNA di *SARS-Coronavirus*; in un paziente si isolava un *Coxsackievirus B* da lavaggio nasale e tampone faringeo, quest'ultimo campione era positivo anche alla PCR per *Enterovirus*, erano presenti gli anticorpi specifici fissanti il complemento; in un altro paziente veniva isolato un *Adenovirus* dai materiali respiratori; in due pazienti si faceva diagnosi sierologica rispettivamente di Infezione da *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*. Due pazienti sono al momento privi di diagnosi eziologica.

G051

**IL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO
E L'INFEZIONE DA CMV:
RISULTATI DI UN MONITORAGGIO
IN ETÀ PEDIATRICA**

Rabagliati A.M., Finello F., Pessina R., Cappelli B*, Erba D*,
Ricci R.

Laboratorio Centrale Analisi, IRCCS G. Gaslini,
L.go G. Gaslini 5, 16147 Genova.

*Dipartimento di Ematologia e Oncologia Pediatrica, IRCCS
G. Gaslini, Genova

Scopo del lavoro. La messa a punto del test dell'antigenemia per citomegalovirus (Ag-CMV) ha creato una svolta importante nella storia dei trapianti poiché ha reso possibile il monitoraggio dell'infezione-malattia citomegalica. Dopo diversi anni di monitoraggio di soggetti in età pediatrica sottoposti a trapianto di midollo, si è voluto valutare in quale epoca post trapianto si è avuta la prima Ag-CMV positiva e verificare se c'erano differenze in funzione del grado di correlazione tra Donatore (D) e Ricevente (R).

Metodologia. La popolazione presa in considerazione è costituita da 69 soggetti di età compresa tra 5 mesi e 20 anni che durante i 5 anni di osservazione (1.7.1997-30.6.2002) sono stati sottoposti a trapianto di midollo osseo (complessivamente n° 71 trapianti) di tipo allogenico, sia correlato (Allo-C n° 26) che non correlato (Allo-NC n°45). e monitorati per almeno tre mesi. Complessivamente sono stati analizzati i risultati di 2423 Ag-CMV.

Risultati. Per ogni trapianto sono state eseguite, mediamente, n° 5,5 antigenemie/mese con percentuali di poco più alte per gli Allo-NC rispetto agli Allo-C e nel 1° trimestre rispetto al 2° trimestre.

Su tutto il gruppo di trapianti seguiti, il 56,3% (40/71) ha presentato almeno una Ag-CMV positiva, ma se si escludono quelli con sierologia pre trapianto verso CMV negativa di R e D che non hanno mai presentato un'antigenemia positiva, la percentuale sale al 72,7% (n°40/55) più precisamente al 61,1% per gli Allo-C e al 78,4% per gli Allo-NC.

Per 39 dei 40 trapianti (97,5%) che hanno presentato almeno un'antigenemia positiva, la prima positività si è avuta nel 1° trimestre post trapianto (+11gg. / +60gg.) e solo 1 su 40 (2,5%) si è avuta al 9° mese a +244gg. Il numero medio di elementi positivi su 200.000 è stato 3,1 per Allo-C e 8,1 per Allo-NC.

Conclusioni. Dai dati analizzati è emerso che, per i trapianti allogenici in pediatria, il periodo più critico per la prima Ag-CMV positiva è anticipato (media +33gg.) rispetto a quanto riportato in letteratura e i trapianti Allo-NC si confermano quelli più a rischio.

G052

**INFEZIONE DA HIV-2 IN SOGGETTI
EXTRACOMUNITARI DI ORIGINE SENEGALESE**

Rizzo A., Faneschi M.L., Sticchi Damiani A., Pizzolante M.,
Congedo P.

Laboratorio di Microbiologia *Unità Operativa di Malattie
infettive A.S.L. LE/1 - Presidio Ospedaliero "Vito Fazzi",
Piazza F. Muratore, 73100 Lecce

Obiettivi della ricerca: HIV-2 è un retrovirus che, insieme a HIV-1, appartiene alla sottofamiglia dei Lentivirinae; è particolarmente simile al SIV, il virus della scimmia *Macacus*. L'infezione è largamente diffusa in Africa Occidentale, si trasmette per via sessuale e dalla madre al feto. Al pari di HIV-1 provoca nell'uomo una sindrome da immunodeficienza, ma con decorso più lungo e benigno.

Descriviamo due casi clinici in soggetti extracomunitari senegalesi ricoverati nel nostro nosocomio nel corso dell'anno 2002 per ascessi cutanei suppurati e fistolizzati nei quali l'esecuzione del test HIV 1/2 COMBI-test IV generazione - ditta Roche, risultava nettamente positivo (assorbanza >1000). Si fa presente che i casi di HIV-2 in Italia sono veramente rari e legati esclusivamente a pazienti provenienti da paesi in cui tale virus è endemico. Spesso quindi solo l'utilizzo di un test di screening che saggi contemporaneamente gli anticorpi contro entrambi i virus può essere un utilissimo

campanello di allarme di una situazione di infezione. La sintomatologia clinica d'altronde, estremamente subdola e sfumata, non è tale da fare insorgere un sospetto diagnostico di AIDS.

Metodologia usata: La positività del test di screening per HIV 1 /2 ha richiesto, come sempre, l'esecuzione del test di conferma con Western-blot HIV-1 (ditta Biorad). Si osservano in entrambi i casi la presenza delle seguenti bande

POL p34

p68

GAG p24

Risultato INDETERMINATO ma altamente suggestivo per infezione da HIV-2

Ricerca di carica virale eseguita con metodica AMPLICOR HIV-RNA monitor - ditta roche - inferiore a 400 copie /ml.

Linfociti CD4 in percentuale superiori al 30% in un caso al 50% nell'altro.

Risultati e conclusioni: La provenienza geografica dei soggetti, la sintomatologia clinica e i dati di laboratorio hanno fatto sospettare un'infezione da HIV-2, confermata successivamente con Western-blot HIV/2 - ditta BIORAD.

G053

INFEZIONI DA *C. TRACHOMATIS*, HPV E *CANDIDA SPP*: ESPERIENZA NEL BIENNIO 2001-2002 IN UN GRUPPO DI DONNE IN ETÀ FERTILE

Schiavone M.L., Ursitti A., De Sandro M.V., Pontani G.,
Tuccinardi C., Pietrobattista P.*, Del Vecchio A.M.*, Spanò A.

Servizio di Microbiologia-Ospedale "S. Pertini"

* Consultorio di Tor Cervara, ASL RM/B

Obiettivo: Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare la prevalenza di alcune infezioni uro-genitali in un gruppo di donne, sessualmente attive ed in età fertile, e fornire informazioni quantitative in grado di migliorare la prevenzione primaria e le procedure di screening sulle malattie sessualmente trasmesse. In particolare, sono stati considerati tre agenti responsabili di MST (*C. trachomatis*, HPV e *Candida spp.*), utilizzando come strumenti diagnostici di laboratorio test biomolecolari, che hanno consentito di rilevare l'infezione in mancanza sia di segni e sintomi specifici, sia di alterazioni citomorfologiche.

Materiali e metodi: Lo studio, svolto dal 26.03.2001 al 17.12.2002, è stato condotto tra il Consultorio di Tor Cervara ed il Servizio di Microbiologia dell'Ospedale S. Pertini di Roma, con la collaborazione di 295 donne di età compresa tra i 18 ed i 45 anni. Il protocollo ha previsto una visita di arruolamento durante la quale le donne, dopo aver fornito il loro consenso a partecipare allo studio, sono state sottoposte alla compilazione di un questionario specifico per la raccolta dell'anamnesi, ad una visita ginecologica ed alla raccolta di campioni biologici. I campioni prelevati sono stati sottoposti ad indagini molecolari, per quanto riguarda *C. trachomatis* ed HPV (metodica C.t. Abbott LCR, metodica Digene CT-ID Test, metodica Digene HPV Test), ed isolamento colturale, per quanto riguarda *Candida spp.*

Risultati La ricerca di HPV è risultata positiva in 39 campioni: 25 positivi per HPV ad alto rischio, 10 positivi per HPV a basso rischio, 4 positivi per HPV sia ad alto che a basso rischio. Dei 25 campioni positivi per HPV ad alto rischio, soltanto in 2 casi è stata riscontrata una correlazione con il Pap test, risultato L-SIL-HPV in uno ed H-SIL-HPV nell'altro; mentre in un altro caso il Pap test è risultato negativo in paziente con pregressa conizzazione del 1998. La

ricerca di *C. trachomatis* da tampone endocervicale è risultata positiva in 7 campioni. La ricerca di *C. trachomatis* uretrale è risultata positiva in 9 campioni urinari. In tre casi l'infezione da *C. trachomatis* era estesa sia al distretto endocervicale che a quello uretrale. La ricerca di *Candida spp.* è risultata positiva in 72 tamponi vaginali che sono stati sottoposti ad identificazione biochimica e ad antimicrogramma.

Conclusioni Dai risultati ottenuti si nota come la prevalenza di queste infezioni risulta essere del 5% per le infezioni da *C. trachomatis*, del 12% per le infezioni da HPV e del 25% per le infezioni da *Candida*. Si tratta di percentuali piuttosto alte se si considera che i soggetti analizzati non presentavano alcun segno e sintomo specifico di infezione e che soltanto in due casi il Pap test è risultato positivo per HPV.

G054

IMPLEMENTAZIONE SCREENING PER LA VALIDAZIONE BIOLOGICA DELLE UNITÀ DI SANGUE DELLA REGIONE LAZIO

Ursitti A., Schiavone M.L., Abbate I., Ronchi I., Spanò A.

Servizio di Microbiologia, Virologia ed Immunologia

Ospedale "S. Pertini" ASL RM/B

Razionale Il Centro di Riferimento Regionale Sicurezza Trasfusionale del Dipartimento di Diagnostica Strumentale ASL RM/B attivato dal 1.10.2001 per la ricerca dei costituenti virali dell'HCV propone l'estensione ai test molecolari relativi all'HIV-RNA ed HBV-DNA sulle unità di sangue raccolte nella Regione Lazio.

I dati riportati dalla letteratura scientifica degli ultimi anni indicano come il rischio d'infezioni da HBV, HCV ed HIV associate alla trasfusione si sia drasticamente ridotto, ma non del tutto annullato.

Attualmente sulle donazioni vengono eseguiti esclusivamente i test sierologici - con metodologia ELISA - tesi a rilevare rispettivamente l'anti-HIV e l'HbsAg. Ciò comporta la possibilità di trasfondere unità di sangue potenzialmente capaci di trasmettere infezione, ma risultate negative ai test di screening. Le cause possono essere ricondotte all'effettuazione della donazione nel periodo finestra, a donatori portatori d'infezione che non sierocvertono ed a varianti virali.

Metodologia L'estensione del programma di sicurezza trasfusionale ai test per la ricerca dei costituenti virali dell'HIV ed HBV con metodologia NAT non comporterà mutamenti organizzativi da parte del Centro di Riferimento Regionale per la Sicurezza Trasfusionale.

- L'attuale rete di raccolta dei campioni dei SIT della Regione Lazio, attivata nell'ottobre del 2001, che prevede l'utilizzo di sei autovetture si è rivelata efficiente ed in grado di rispondere prontamente anche a modifiche improvvise dei percorsi di raccolta.

- L'implementazione dei suddetti parametri non prevederà alcun aumento nel numero di campioni da trasportare, in quanto lo stesso campione verrà utilizzato per la determinazione contemporanea di HCV- RNA, HIV-RNA ed HBV-DNA,

- L'aumento del carico di lavoro sotteso alla determinazione dei costituenti posti in premessa non modificherà gli attuali tempi di risposta definiti entro e non oltre le 36 ore dal prelievo, così come la risoluzione dei pool positivi entro 48 ore.

Conclusioni I dati preliminari dello screening NAT-HCV indicano indubbiamente la validità di tale approccio in termini di prevenzione del rischio trasfusionale residuo, infatti, sebbene finora siano stati testati soltanto 819.000 donatori,

tre di questi sono risultati HCV-RNA positivi ma negativi alla ricerca degli anticorpi per il Virus dell'epatite C rafforzando la convinzione che la strada intrapresa è quella giusta e ci può realmente avvicinare all'obiettivo "rischio zero".

G055

VALUTAZIONE EPIDEMIOLOGICA DI UNA EPIDEMIA DI GASTROENTERITE DA NORWALK LIKE VIRUS

Vecchi E.; Pecone L.F.; Righi E.

Università di Modena e Reggio Emilia,
Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche e statistiche,
Via Campi, Modena, tel. 059/2055456,
e-mail lufloren@yahoo.it

Scopi L'analisi ha lo scopo di osservare dal punto di vista epidemiologico una epidemia di gastroenterite (g.e.) acuta: si è preso come esempio un episodio provocato dal Norwalk Like Virus (NLV) in un campeggio della Virginia (USA) nel luglio del 2001. Tra i 40.000 campeggiatori suddivisi in gruppi di 40-90 persone ciascuno, si sono avuti 56 casi di g.e. acuta in 3 dei gruppi. Per caso si intende un soggetto con presenza di rashe, vomito, diarrea, febbre, cefalea e tosse.

Metodologia La formula $R_1 = AR \cdot K \cdot D \cdot S$ dove R_1 è il numero di soggetti che si infettano a partire da un soggetto infetto e infettante in un certo periodo di tempo, AR è il tasso d'attacco o d'incidenza, K è il numero di contatti per unità di tempo, D è la durata del periodo d'infettività e S è la quota di suscettibili, permette di stimare la possibilità di diffondere di questo virus.

Per limitare l'epidemia, bisogna agire sui 4 fattori della formula per ottenere $R_1 < 1$: si può pertanto controllare l'utilizzo di quella che è la via di trasmissione classica del patogeno, diminuire i contatti tramite isolamento o modificazione dei comportamenti a rischio, somministrare antibiotici o altro per ridurre il periodo d'infettività, fornire un'immunità attiva o passiva quando è possibile.

Risultati Ponendo i casi accertati in un grafico temporale, si ottiene una distribuzione che indica una sorgente puntiforme d'infezione. Nell'epidemia qui considerata si è agito su K con l'isolamento dei casi, limitando i contatti tra sani e malati, e disinfettando le aree comuni e i servizi igienici. L'AR era del 23%.

L'analisi con RT-PCR delle feci del 15% dei casi evidenzia una positività per NLV nel 75% dei campioni esaminati: il risultato però giunse settimane dopo la scomparsa dei sintomi non consentendo così di agire su D mediante somministrazione di sostanze terapeutiche. S è vicino costantemente al 100% in quanto non esiste un vaccino, né la possibilità d'instaurare un'immunità post-infezione.

Conclusioni Considerata l'elevata incidenza di g.e. da NLV (96% delle g.e. non batteriche dal 1/96 al 7/97 segnalate al CDC), l'alto tasso d'attacco (fino all'82%), l'impossibilità di costituire un'immunità post-infezione, una bassa dose infettante (< 100 virioni), la molteplicità dei meccanismi di trasmissione (acqua, aerosol, cibo, persona-persona), le caratteristiche della popolazione maggiormente colpita (bambini < 5 anni e poveri) e l'elevata morbosità, morbidità e mortalità legata alle gastroenteriti da NLV, l'analisi epidemiologica di questo focolaio epidemico dimostra come molto spesso per il controllo di epidemie non è possibile agire in via preventiva, se non preparando un vaccino. È anche utile l'uso del Microscopio Elettronico e dell'ELISA per una diagnosi più rapida dell'infezione quando si sospetta un'etiologia virale e in particolare di Norwalk Like Virus.

BIBLIOGRAFIA

1. CDC. Norwalk-Like Virus associated gastroenteritis in a large high density encampment-Virginia, July 2001. MMWR 2002; 51(30):661-3

G056

EPATITE B OCCULTA IN SOGGETTI HBSAG NEGATIVI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI FEGATO PER CIRROSI SCOMPENSATA.

Zaccaria T., Franchi I., Zamboni F*, Marzano A.*, Barbui A., Franchello A.*, Carenzi S.*, Ghisetti V., Marchiaro G.

Dipartimento di Patologia Clinica, S.C. Microbiologia,
*Centro Trapianto di Fegato, **Dipartimento di Gastroenterologia.
Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista, Molinette, Torino.

L'infezione occulta da virus dell'epatite B (HBV) in soggetti negativi per l'antigene di superficie di HBV (HBsAg) è stata descritta in correlazione sia con un danno epatico su base criptogenetica sia con l'infezione da virus dell'epatite C (HCV). Tuttavia, l'entità clinica dell'epatite B "occulta" rimane da definire. Abbiamo studiato la presenza dell'infezione occulta da HBV nel fegato di soggetti HbsAg negativi sottoposti a trapianto e correlato la presenza dell'infezione alla recidiva epatitica nel post-trapianto e al rigetto.

Metodi. Tessuto epatico prelevato al momento del trapianto da 9 donatori e da 34 riceventi -14 HBsAg negativi e 20 HBsAg positivi- è stato analizzato per la presenza di HBV-DNA mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizzando set di primers indipendenti per il gene Core (nested-PCR) ed envelope (S) (real-time PCR e nested-PCR).

Risultati. La presenza di epatite occulta da HBV, definita dalla positività per entrambi i geni di HBV nel fegato, è stata identificata in 9 pazienti HBsAg negativi (64%), 7/9 con infezione da HCV. La carica virale intraepatica era più bassa nei soggetti HBsAg negativi che in quelli HBsAg positivi (valore mediano di HBV-DNA 1.14 $\log_{10}/\mu\text{g}$ DNA vs. 3.6 \log_{10} , $p < 0.0001$). Nessuno dei pazienti con epatite B occulta aveva HBV DNA plasma (uno solo nei linfociti) e nel fegato dei relativi donatori non è stato evidenziato HBV. Nessuno paziente ha recidivato HBV dopo il trapianto e non è stata evidenziata un aumento del rischio di rigetto.

Conclusioni. L'epatite B occulta è frequente nei soggetti HBsAg negativi con cirrosi allo stadio terminale avviati al trapianto epatico, ma non è associata allo sviluppo di una epatite B "de novo" né ad un rischio aumentato di rigetto nel post-trapianto. Il basso livello di HBV DNA nel fegato dei pazienti con infezione occulta suggerisce che HBV sia presente in uno stato di replicazione inattiva.

G057

PREVALENZA DEGLI ANTICORPI ANTI-HAV IN DONNE GRAVIDE E INCIDENZA NEI LORO FIGLI NEL CORSO DEL PRIMO ANNO DI VITA.

Terulla V.¹; Zara F.²; Brerria R.²; Terulla C.²; De Silvestri A.³; Zucca S.¹; Dotta M.¹; Pizzini D.¹; Casali E.¹; Polatti F.¹; Belloni C.³.

¹Servizio analisi microbiologiche IRCCS Policlinico San Matteo

²Dip. S.M.E.C. Sezione di Microbiologia Università di Pavia

³Divisione di Neonatologia-Patologia Neonatale IRCCS Policlinico San Matteo 4Clinica Ostetrica Ginecologica Dip. SMEC Università di Pavia

In un'area a bassa/intermedia endemia (10-20/100000ab/anno), una elevata percentuale di donne al parto risulta HAV-sieronegativa. La presente ricerca si propone di valutare, su una popolazione di donne residenti a Pavia e rispettivi neonati lo stato di eventuale HAV-sieropositività e la presenza di HAV-RNA in campioni seriali di plasma e feci.

Le donne gravide sono state valutate per la presenza di IgM-IgG anti-HAV. A tutti i neonati arruolati è stata valutata la reattività HAV-IgG e IgM alla nascita e sono stati prelevati campioni di feci al 1°, 2° e 3° mese di vita al fine di accertare l'eventuale escrezione di HAV-RNA in caso di infezione. La ricerca degli anticorpi anti-HAV IgG è stata eseguita mediante metodica MEIA (AxSYM HAVAB 2.0, Abbott Italia) dosaggio quantitativo utilizzando una curva di calibrazione a 5 calibratori: 0, 5, 10, 20, 50, 100 mIU/ml, la ricerca degli anticorpi HAV IgM è stata eseguita sempre con la stessa metodica MEIA (AxSYM HAVAB-M 2.0 Abbott Italia). Nei campioni di feci è stata effettuata la ricerca dell'RNA virale mediante RT-PCR seguita da una nested-PCR al fine di elevare la sensibilità della metodica.

Delle 269 coppie madre-bambino arruolate le IgM sono risultate negative in tutti i campioni, mentre le IgG sono risultate positive (>10 mIU/ml) in 69 coppie (25,6%; IC 95%: 20,5-31,3%). Ai bambini negativi sono stati raccolti 3 campioni di feci (al 1°, 2° e 3° mese di vita) per la determinazione dell'HAV-RNA. Disponiamo di 177 campioni di feci al 1° mese, di 139 al 2° e di 110 al 3° mese. Una bambina è risultata HAV-RNA positiva al 2° campione, mentre era negativa al 1° ed al 3°.

Ci si propone di arruolare tutti i figli di madre HAV negativa e mantenuti negativi ai 3 controlli dell'HAV-RNA fecale per la vaccinazione anti-HAV già nel 1° anno di vita.

G058

APPROPRIATEZZA DI METODI MOLECOLARI AVANZATI PER LA DIAGNOSI DI LABORATORIO DI MALARIA: 2 ANNI DI ESPERIENZA

Calderaro A., Perandin F.¹, Piccolo G., Zuelli C., Bommezzadri S., Incaprera M., Dell'Anna L.¹, Arcangeletti M.C., Medici M.C., Ricci L.², Manca N.¹, Chezzi C., Dettori G.,

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma, Viale Gramsci 14, 43100 Parma, ¹Istituto di Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Brescia; ²Arcispedale di Reggio Emilia.

Introduzione. La diagnosi di laboratorio di infezione da

Plasmodium falciparum (Pf.), *P. vivax* (Pv.), *P. ovale* (Po.), *P. malariae* (Pm.), si basa sull'esame microscopico, tutt'ora indagine di riferimento, rapida e poco costosa, ma poco sensibile nel rivelare infezioni a bassa parassitemia e infezioni miste. Di recente, indagini molecolari avanzate, altamente sensibili e specifiche, si stanno opportunamente affiancando ai metodi tradizionali al fine di superarne i limiti. Tale opportunità è stata proposta a partire dal Febbraio 2002 presso il nostro laboratorio e qui verranno descritti i risultati fino ad oggi osservati (Febbraio 2002-Maggio 2003).

Materiali e Metodi. Sono stati esaminati 178 campioni di sangue provenienti da 109 pazienti di cui erano noti i dati clinici. Tutti i primi campioni di ciascun paziente con sospetta malaria sono stati sottoposti a microscopia, saggio immunocromatografico (ICT Pf/Pv), e nested-PCR specie-specifica (18S DNA). La sola microscopia è stata utilizzata in tutti i pazienti nei campioni successivi al primo, per valutare l'efficacia della terapia.

Risultati e Conclusioni. I risultati ottenuti dimostrano che la nested-PCR è complessivamente più sensibile e specifica delle indagini tradizionali. Infatti, è stato confermato mediante nested-PCR un caso di infezione da *P. falciparum*, sospettato in base a dati clinici ed epidemiologici, ma con risultato negativo alla microscopia. Inoltre, sono stati identificati, solo mediante nested-PCR, i plasmodi di 3 pazienti (2 con infezioni miste: 1 Pf. + Pm. e 1 Pf. + Po. + Pm. e 1 con infezione da Pm.), identificabili solo genericamente (3 *Plasmodium* spp.) mediante microscopia. Infine, sono stati correttamente identificati, mediante nested-PCR, 2 casi di infezione da *P. ovale*, erroneamente identificati *P. vivax* mediante microscopia. D'altra parte, due casi di infezione da *P. ovale*, correttamente identificati mediante microscopia, non sono stati rivelati mediante nested-PCR, verosimilmente perché in presenza di 2 ceppi di plasmodio mutati nella sequenza bersaglio. Sono in corso studi per verificare tale ipotesi.

G059

IDENTIFICAZIONE E ANTIBIOGRAMMA DI BACILLI GRAM NEG. NON FERM. BD PHOENIX VS SISTEMI MANUALI DI RIFERIMENTO

Ferrari L.

Laboratorio di Microbiologia

Azienda Istituti Ospitalieri, Cremona

Introduzione

Lo scopo dello studio è stato quello di verificare le performance del sistema automatico BD Phoenix nei confronti di bacilli Gram negativi non fermentanti. Sono stati indagati: accuratezza dell'identificazione (ID), dell'antibiogramma (AST) e loro tempi di definizione. Le condizioni operative hanno tenuto conto delle realtà e delle esigenze di un laboratorio di routine ospedaliera.

Il confronto è stato condotto Vs dati ottenuti con sistemi manuali di riferimento

Materiali e metodi

Sono stati processati (72) ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*, (26) *Stenotrophomonas maltophilia*, (14) *Acinetobacter lwoffii* e (9) *Acinetobacter baumannii*. I ceppi di recente isolamento clinico sono stati processati in doppio mediante pannelli PHOENIX NMIC/ID4. Le sospensioni batteriche e l'inoculo dei pannelli sono state effettuate come indicato da specifiche metodiche, partendo da colonie sviluppatesi su agar Mac-Conkey. Contemporaneamente i ceppi sono stati identificati mediante gallerie API NE (Bio-Merieux) e l'anti-

biogramma è stato determinato in terreno solido secondo Kirby-Bauer. Sono stati impiegati dischetti di: Amikacina, Gentamicina, Aztreonam, Cefotaxime, Ceftazidime, Cefepime, Imipenem, Meropenem, Piperacillina, Piperacillina-Tazobactam, Ciprofloxacina, Levofloxacina oltre a Cloramfenicolo e Trimetoprim-sulfa per *Stenotrophomonas maltophilia*. Gli aloni d'inibizione sono stati interpretati secondo le regole NCCLS.

Risultati e conclusioni

Per quanto riguarda *Ps.aeruginosa* 72×2 pannelli hanno fornito 141 ID corrette con un'accuratezza a livello di specie del 97.9% e una riproducibilità delle repliche pari al 95.7%. *St. maltophilia* 26×2 pannelli hanno fornito 50 ID corrette con un'accuratezza a livello di specie del 96.2% e una riproducibilità delle repliche pari al 92.3%.

Per *A. lwoffii* e *baumanii* 14×2 e 9×2 pannelli hanno fornito rispettivamente 24 e 17 corrette ID con la presenza di alcuni errori di ID a livello di specie, ma non di genere e riproducibilità delle repliche pari al 71.5 e 88.8%. Da considerare che gli errori più frequentemente riscontrati sono stati errori dovuti alla mancata identificazione del ceppo (7 su 242 pannelli).

Anche per i risultati relativi all'esecuzione dell'antibiogramma Phoenix ha dimostrato estrema accuratezza. Le repliche hanno evidenziato grande riproducibilità dei dati. Le rare discrepanze riscontrate rispetto Kirby-Bauer hanno interessato soltanto intervalli Sensibile-Intermedio o Intermedio-Resistente. Eccezionali sono le discrepanze Sensibile-Resistente.

G060

RIVALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DI *GARDNERELLA*, *TRICHOMONAS VAGINALIS* E *CANDIDA* NELL'ESSUDATO VAGINALE CON SONDE MOLECOLARI

Casari E., Ferrario A., Cristiano A., Grazioli V.

Sezione di Microbiologia, "Istituto Clinico Humanitas",
Via Manzoni 56, 20090 Rozzano, Milano

Introduzione: nell'etiologia delle vaginiti/vaginosi *Gardnerella vaginalis* (GV), *Candida* spp. (CS) e *Trichomonas vaginalis* (TV) sono i microrganismi chiamati più frequentemente in causa; le metodiche di laboratorio classicamente deputate alla loro ricerca (lettura del vetrino dell'essudato vaginale a fresco o dopo colorazione di Gram, coltura in terreni selettivi), oltre a dipendere dalla correttezza di esecuzione del prelievo, presentano, a fronte di un costo contenuto, lo svantaggio di produrre risultati troppo soggetti ad una valutazione soggettiva con tempi che possono arrivare alle 48 ore.

Da pochi anni è disponibile un kit (Affirm VPIII, Becton Dickinson and Company, Sparks, Md.) per la ricerca, mediante ibridazione diretta con sonde DNA specifiche, dei genomi di GV, CS e TV nell'essudato vaginale; la metodica, dotata di adeguata sensibilità analitica, è completata in 40 minuti.

Obiettivo: abbiamo deciso di rivalutare, utilizzando il kit Affirm VPIII, la prevalenza di GV, CS e TV nell'essudato vaginale delle donne che sono giunte alla nostra osservazione sia per sospetta vaginite che per screening routinario prefecondazione assistita.

Materiali e metodi Da gennaio 2002 ad aprile 2003 sono state studiate 2300 donne con età compresa fra i 14 e i 65 anni (650 candidate alla fecondazione assistita e 1655 con disturbi riferibili a vaginite/vaginosi).

Risultati

ETA'	Gardnerella	Trichomonas	Candida spp
>55 (n=110)	19,1%	0,0%	7,3%
55-45 (n=130)	33,8%	3,8%	16,1%
35-45 (n=530)	19,6%	0,4%	9,8%
25-35 (n=750)	20,4%	0,5%	12,1%
<25 (135)	25,9%	0,7%	18,5%
ETA'	Gardnerella	Trichomonas	Candida spp
35-45 (n=400)	19,3%	0,5%	9,0%
25-35 (n=250)	17,7%	1,1%	9,3%

Conclusioni

1) Per quanto riguarda i soggetti sintomatici, pur con i dovuti distinguo relativi all'area geografica di origine, i risultati, almeno per quanto riguarda GV e CA, sono in linea con quanto riportato dalla letteratura internazionale

Autore	Gardnerella	Trichomonas	Candida spp
Di Bartolomeo S	23,8%	2,4%	17,8%
Hong S	26%	4%	11%
Acikgoz ZC	13,8%	2,2%	26,8%

2) Viene confermato che GV è il più frequente, soprattutto nelle pazienti fra i 45 e i 55 anni

3) Non si evidenziano differenze fra la popolazione sintomatica e quella apparentemente asintomatica

4) Questi primi dati suggeriscono una rivalutazione del ruolo di questi agenti nella genesi delle vaginiti.

G061

TIPIZZAZIONE AUTOMATICA IS6110 DI *M. TUBERCULOSIS* MEDIANTE IL SISTEMA ROBOTIZZATO RIBOPRINTER®

Barreca P.M., Pittaluga F., Marchiaro G., Cirillo D.

Laboratorio di Microbiologia Clinica AO San Giovanni Battista, cso
Bramante 88, Torino

L'aumento dei casi di tubercolosi, l'insorgenza e la diffusione di ceppi di *M. tuberculosis* multiresistenti (MDR), hanno stimolato lo sviluppo di nuove tecniche di tipizzazione molecolare considerate importanti strumenti per la sorveglianza della malattia. L'analisi RFLP delle sequenze di inserzione IS6110 è considerata la tecnica "gold standard" per lo studio epidemiologico della tubercolosi. Nonostante l'elevato potere discriminante, questo metodo presenta lo svantaggio di possedere lunghi tempi di esecuzione e richiede esperienza nell'interpretazione dei patterns. Il RiboPrinter® è un sistema automatico sviluppato per la ribotipizzazione batterica in grado di effettuare anche analisi automatiche in Southern blot. Questo sistema è stato da noi utilizzato per la tipizzazione automatica IS6110 di *M. tuberculosis*. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la riproducibilità del sistema RiboPrinter® per la tipizzazione IS6110 automatizzata di *M. tuberculosis* paragonandolo ai sistemi di tipizzazione manuali.

Sono stati isolati e tipizzati 44 ceppi di *M. tuberculosis* mediante RFLP-IS6110 convenzionale e PFGE (seguendo i protocolli standard) e mediante RiboPrinter® RFLP-IS6110. Per l'analisi RFLP-IS6110 con RiboPrinter® le cellule sono state trattate con acetone e cloroformio/metanolo (2:1, vol/vol) e risospese meccanicamente in RiboPrinter buffer. L'analisi dei patterns è stata effettuata mediante il software Bionumerics 2.5 per la rivelazione dei clusters.

I risultati ottenuti, analizzati mediante il Software

Bionumerics 2.5, hanno evidenziato una riproducibilità del 100% presentando profili identici degli stessi isolati in esperimenti diversi. Sono stati identificati 18 fingerprints costituiti da 6-10 frammenti e dei 44 ceppi esaminati sono stati individuati 6 clusters. Questi risultati sono stati confermati da RFLP-IS6110 e da PFGE evidenziando un'identica sensibilità fra i tre metodi.

La tipizzazione automatica RFLP-IS6110 mediante RiboPrinter® è un metodo sicuro, riproducibile, di facile esecuzione per la tipizzazione dei ceppi di *M. tuberculosis* e può essere utilizzata per l'identificazione e il monitoraggio in tempi brevi delle epidemie.

G062

IDENTIFICAZIONE E RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI DI CEPPI BEN CARATTERIZZATI ANALIZZATI IN LABORATORI LIGURI

Lemmi M¹., Dho G., Manno G², e. Debbia E.A³ per AMCLI LIGURIA

Lab Analisi Ospedali Galliera, Laboratorio Ricerca e Diagnostica Infettivologica Di.Pe. Istituto G.Gaslini, Sez. Microbiologia DiSCAT, Università di Genova

Uno studio è stato attivato in Liguria per valutare lo stato dell'arte dei laboratori di microbiologia sull'identificazione e sull'accertamento di ben caratterizzate resistenze agli antibiotici.

A tal scopo, 26 ceppi oltre quelli ATCC per controllo, sono stati inviati ai laboratori pubblici e privati che ne avevano fatto richiesta. Solo 7/19 (36.8%) dei centri hanno analizzato tutti i ceppi inviati e 4/19 (21%) hanno eseguito i test su circa la metà dei ceppi. I sistemi più utilizzati sono stati il Vitek e l'Api/ATB. *Staphylococcus aureus* resistente all'oxacillina: il 24% dei test non hanno correttamente evidenziato la resistenza specialmente il ceppo mecA inducibile. *S.haemolyticus*, buona la percentuale delle identificazioni a livello di specie, la valutazione della sensibilità alla teicoplanina è stata elevata 63%. Enterococchi: l'identificazione a livello di specie non è stata brillante (35% non corrette), gli errori si sono concentrati in *E.faecium* e *E.gallinarum*; per la vancomicina-R invece l'85% dei lab che hanno eseguito il test hanno dato un risultato corretto. *S.pneumoniae*: la sensibilità a penicillina ed eritromicina è stata eseguita rispettivamente dal 43% e 36% dei laboratori, con solo il 2% di errori per il primo antibiotico, mentre per eritromicina l'incidenza è stata 7%. Il fenotipo di resistenza è stato riportato solo da 2 laboratori che hanno eseguito il test con la metodica del doppio dischetto. *S.pyogenes*: per il saggio della eritromicina-R valgono le stesse considerazioni di *S.pneumoniae*. ESBL: è alto il numero di risultati non corretti, pari al 47%.

In definitiva molti Laboratori risentono sia delle restrizioni finanziarie, sia del peso della routine che molto spesso condiziona l'esito del saggio. I ceppi inviati per lo studio sono piuttosto rari e quindi di difficile approccio, ma se non identificati correttamente possono dar luogo ad effetti devastanti. Questo studio che continuerà, porterà certamente grossi benefici a tutti i laboratori coinvolti.

G063

DIAGNOSI DI LABORATORIO DI BORRELIOSI, LEPTOSIROSI E SIFILIDE MEDIANTE METODI MOLECOLARI AVANZATI

Calderaro A., Piccolo G., Bommezzadri S., Incaprera M., Zuelli C., Guégan R., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università di Parma, Viale Gramsci 14, 43100 Parma.

Introduzione. Indagini molecolari avanzate si stanno dimostrando sempre più utili nella diagnosi di infezione da microrganismi patogeni di interesse medico, quando opportunamente affiancate a quelle tradizionali, dirette (microscopia e coltura) e indirette (sierologia). Al fine di migliorare sensibilità, specificità ed efficacia dei saggi per la diagnosi di laboratorio di infezione da spirochete patogene è stato deciso di introdurre nel nostro laboratorio, reazioni di PCR per la rivelazione del DNA di *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Leptospira spp.* e *Treponema pallidum*, rispettivamente.

Materiali e metodi. Sono state ampiamente valutate sensibilità, specificità ed efficacia dei tre saggi seguenti: il primo (nested-PCR in singolo tubo) allestito in casa per amplificare un frammento genico di *Borrelia burgdorferi sensu lato*; il secondo (nested-PCR "16SrRNA") allestito in casa per amplificare un frammento genico di *Leptospira spp.*; il terzo (nested-PCR "Treponema pallidum <bmp>", Amplimedical S.p.A.) saggio commerciale per amplificare un frammento del gene "bmp" che codifica per una proteina di membrana del batterio.

Risultati e conclusioni. I saggi di PCR si sono tutti rivelati altamente sensibili, specifici ed efficaci. Il saggio nested-PCR in un singolo tubo potrà essere applicato sia nella diagnosi di laboratorio rapida di malattia di Lyme al fianco delle procedure tradizionali come l'esame colturale, lungo e indaginoso, e l'esame sierologico, poco sensibile e poco specifico, sia per escludere l'infezione in casi di sospetta borreliosi. Il saggio "16SrRNA" è risultato essere un efficace strumento diagnostico da applicare alla diagnosi di laboratorio di leptosirosi, specialmente durante i primi giorni dell'infezione quando altri saggi diagnostici risultano poco sensibili e poco specifici. Infine, il saggio "Treponema pallidum <bmp>", data l'impossibilità di coltivare il batterio *in vitro*, può assumere un ruolo fondamentale nella diagnosi dei casi di lue nei quali le indagini sierologiche sono di dubbia interpretazione o non applicabili, sia per escludere l'infezione in casi sospetti.

G064

CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DI CEPPI DI *HELICOBACTER PYLORI* CON L'IMPIEGO DELLE TECNICHE ERIC-PCR E REP-PCR.

Donati M., Sgarzani C.*, Storni E., Pollini G.M.,
Bandi C.**, Sambri V., Cevenini R.

Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale - Sezione di Microbiologia, Università di Bologna, Policlinico S. Orsola, Bologna, *Servizio di Gastroenterologia, Ospedale S. Maria delle Croci, Ravenna, **Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano.

All'interno della specie *H. pylori* esiste un elevato grado di variabilità genomica. Numerose tecniche di biologia molecolare sono state utilizzate al fine di differenziare i ceppi isolati di *H. pylori*.

Nel presente lavoro è stata eseguita una caratterizzazione genomica di 74 ceppi di *H. pylori* isolati da pazienti sottoposti a gastroduodenoscopia. A tale scopo, sono state impiegate le tecniche ERIC-PCR e REP-PCR.

La metodica ERIC-PCR ha permesso la distinzione dei ceppi di *H. pylori* in due clusters: al primo apparteneva il 47.5% dei ceppi isolati da pazienti con dispepsia non ulcerosa, mentre nel secondo erano compresi in prevalenza (41.2%) ceppi provenienti da pazienti con ulcera e, in più bassa percentuale (29.4%), ceppi isolati da soggetti asintomatici. Una percentuale simile nei due clusters (15% e 14.7% rispettivamente), era rappresentata da ceppi provenienti da pazienti con carcinoma.

Con la tecnica REP-PCR sono stati distinti tre clusters: in uno era raggruppato il 50% dei ceppi isolati dai pazienti dispeptici, mentre erano distribuiti in tutti e tre, con percentuale simile (18.6%, 16.6% e 11.5%), i ceppi provenienti da pazienti con carcinoma. I ceppi isolati da pazienti con ulcera peptica sono stati distribuiti con percentuali simili (37% e 38.5%) in due dei tre clusters.

I dati ottenuti nel presente studio con l'analisi computerizzata dei clusters suggeriscono che, mentre il carcinoma gastrico e la dispepsia non ulcerosa non sembrano essere associati a nessun particolare cluster, gli isolati da quadri di ulcera peptica sono stati associati nel nostro lavoro in un cluster distinto con la ERIC-PCR e in due diversi clusters con la REP-PCR.

L'analisi del genoma dei ceppi di *H. pylori* con l'impiego di una di queste tecniche o di entrambe può essere quindi utile per tipizzare i ceppi di *H. pylori* e per individuare eventuali associazioni tra il loro DNA e patologie ad esso correlate.

G065

RETE ENTER-NET, IL SISTEMA DI SORVEGLIANZA EUROPEO SUGLI ISOLAMENTI DI SALMONELLA RAPPORTO QUADRIENNALE, ITALIA 1999-2002

Galetta P., Caprioli A., Tozzi A., Arena S., Filetici E., Dionisi A.M., Lana S., Owczarek S., Luzzi I.

Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299
00161 Roma

Le tossinfezioni alimentari sostenute da un patogeno ubiquitario come *Salmonella* rappresentano un rilevante problema di sanità pubblica per l'elevata morbosità e per la rilevanza

in termini economici, soprattutto in occasione di eventi epidemici. Le misure di profilassi e di controllo delle infezioni trasmesse da alimenti devono affidarsi a solidi sistemi di sorveglianza basati sui laboratori di microbiologia.

Enter-Net è la rete Europea di sorveglianza delle infezioni enteriche che effettua il monitoraggio delle infezioni da *Salmonella*, *E. coli* O157 ed altri *E. coli* produttori di verocitotossina. La rete è attiva dal 1994 e coinvolge tutti i Paesi dell'Unione Europea. Il coordinamento europeo della rete Enter-Net è presso l'HPA di Colindale. La rete nazionale Enter-Net Italia, coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità, si avvale della partecipazione di laboratori diagnostici che operano nel settore di microbiologia clinica, veterinaria e ambientale.

Negli ultimi quattro anni di attività, la struttura della rete ENTER-NET Italia si è consolidata. L'attività di sorveglianza integrata (isolamenti da uomo, da animali, da alimenti e da ambiente), di tipizzazione, di monitoraggio dell'antibiotico resistenza, ha permesso di conoscere l'ecosistema delle salmonelle italiane, di determinare sierotipi emergenti, di valutare il fenomeno della resistenza multipla agli antibiotici. Questo ha consentito che i dati italiani venissero diffusi e analizzati insieme a quelli degli altri Paesi europei e che venissero identificati e controllati episodi epidemici di tossinfezione alimentare sia di carattere nazionale che transnazionale. Tuttavia, occorre ancora implementare a livello nazionale un rapido flusso di informazioni, migliorare la completezza delle segnalazioni ricevute ed incrementare la copertura geografica che è carente in alcune regioni come è evidenziabile dal confronto tra segnalazioni alla rete Enter-Net e notifiche di salmonellosi.

galetta@iss.it

G066

INTEGRITÀ DELL'ISOLA DI PATOGENICITÀ DI *HELICOBACTER PYLORI* ED ASSOCIAZIONE CON L'ULCERA PEPTICA

Gomez-Miguel M.J.¹, Petrucci C.¹, Topa S.¹, Benedetti I.¹, Pietroiusti A.², Porowska B.³, Covotta A.⁴, Mascelino M.T.⁵, Luzzi I.¹

¹Dip. Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma, ²Dip. Medicina Interna, Università "Tor Vergata", Roma, ³Dip. Chirurgia generale "Paride Stefanina", ⁴Dip. Scienze Chirurgiche e Tecnologie Mediche Applicate e ⁵Clinica di Malattie Infettive, Università "La Sapienza", Roma

Due putativi fattori di virulenza di *H. pylori* (HP), l'isola di patogenicità (*cagPAI*) e la tossina vacuolizzante (*vacA*), sono stati associati ad un incremento nel rischio di sviluppare ulcera peptica (UP) o carcinoma gastrico nei soggetti infetti da questo batterio. *CagA*, una proteina fortemente immunogenica codificata da uno dei geni della *cagPAI*, viene utilizzata come marker della presenza dell'isola, analizzando la risposta serologica specifica dell'ospite e/o la presenza del gene nel batterio. La intensa attività proinfiammatoria dei ceppi *cagPAI*-positivi non è dovuta, però, al *cagA*, ma ad altri geni della *cagPAI*, la cui assenza potrebbe modificare la virulenza del batterio. Scopo del nostro lavoro è stato caratterizzare la diversità genetica del *cag PAI* ed il *vacA* in ceppi di HP, e analizzare la loro associazione con l'UP. Sette geni del *cag PAI* (*cagA*, *cagE*, *cagF*, *cagM*, *cagT*, *cagI3* e *cag 6*), l'empty site e le varianti alleliche s/m del *vacA* di 131 ceppi di HP (47 da soggetti con UP e 84 da soggetti con dispepsia non ulcerosa, NUD) sono stati analizzati mediante PCR. Il

51% ed il 77% dei ceppi NUD e UP rispettivamente, era positivo per *cagA*, mentre una *cagPAI* integra era presente nel 45% e 68% dei ceppi NUD e UP, rispettivamente. In 14 pazienti erano presenti contemporaneamente ceppi *cagPAI* negativi e positivi, ma in 6 di questi ultimi mancavano uno o più geni della *cagPAI*. Delezioni in geni della *cagPAI* erano anche presenti in altri 8 ceppi. In totale, il 12% (10/84) dei pazienti NUD ed il 9% (4/47) dei UP presentavano ceppi contenenti delezioni nel *cagPAI*. Il gene *cagM* si è dimostrato il marker più preciso della presenza di una *cagPAI* integra. Sebbene *cagA* mancava in 5 ceppi NUD *cagPAI*-positivi, questo gene è stato più utile della intera *cagPAI* nella discriminazione di pazienti a maggior rischio di PUD. Nella nostra popolazione, *cagA*, *cagPAI* integra, ed il genotipo *vacA s1* di HP sono associati ad un elevato rischio di UP.

G067

LA NOSTRA ESPERIENZA NELLA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI MICOBATTERI: "INNO-LIPA MYCOBACTERIA" E "MYC-TE ABANALITICA"

Morelli S.¹, Ferri M², Nanetti A.¹

¹Dip. Med. Clin. Spec. e Sper. Sez. Microbiologia Università di Bologna,
²U.O. Microbiologia - Azienda Ospedaliera S. Orsola Bologna.

Introduzione: visto l'elevato incremento delle infezioni da *Tuberculosis complex* e la comparsa di micobatteri non tubercolari *MOTT* in parte dovuta all'aumento dei pazienti immunodepressi ed in parte ancora di dubbio significato clinico, abbiamo avuto la necessità di introdurre nella pratica quotidiana l'uso di tecnologie molecolari sia per ridurre i tempi di refertazione, sia per identificare in maniera "univoca" queste "nuove" specie.

Materiali e metodi: dal 2001 abbiamo adottato nella routine la tipizzazione molecolare dei micobatteri con Inno-Lipa Innogenetics (PCR della regione ribosomiale 16S-23S rRNA e successiva ibridazione con sonde a sequenza specifica) parallelamente alle colture classiche allestite in terreno solido e liquido, con una significativa riduzione nei tempi di refertazione. In alcuni casi però non siamo riusciti ad andare oltre all'identificazione del genere *Mycobacterium* nemmeno con l'uso della versione Inno-Lipa V2 arricchita in sonde specifiche, quindi ci siamo avvicinati ad una metodica per noi nuova che potesse compensare le nostre "lacune": la MYC-TE Abanalitica che utilizza prima una PCR di una regione del gene *p65* (proteina di 65KD) e poi una digestione combinata di 2 RLFP. L'interpretazione avviene con migrazione dei frammenti in gel di agarosio al 3%. Nello specifico sono stati valutati tre ceppi non identificabili con Inno-Lipa, e per verificare la soggettività o meno delle valutazioni dopo corsa elettroforetica abbiamo fatto interpretare i patterns di reazione ottenuti a due diversi operatori.

Risultati: il campione 1 è stato tipizzato in modo concorde come *Myc. flavescens*, il 2 come *Myc. genevense* mentre il terzo ha dato pareri contrastanti: *Myc. kansasii* in un caso e *Myc. avium* nell'altro. A parere nostro solo la prima valutazione è accettabile poiché quella specie non è identificabile dalle sonde contenute in INNO-LIPA, mentre le altre due assolutamente no perché sia nel caso di *Myc. genevense* che del gruppo *Myc. avium-kansasii* ne avremmo avuto riscontro in INNO-LIPA V2.

Conclusioni: pur considerando le tecniche molecolari come assolutamente fondamentali nella pratica quotidiana sia per la rapidità dei risultati forniti che per la loro sensibilità e spe-

cificità, riteniamo che a tutt'oggi non possano sostituire in maniera totale i test tradizionali, ma se usate come complemento a questi sono un elemento fondamentale in particolare per anticipare significativamente i tempi di refertazione ed andare meglio incontro a quelle che sono le esigenze del clinico.

G068

FATTIBILITÀ DI UN SISTEMA DI TIPIZZAZIONE DI *C. JEJUNI* BASATO SULLE MUTAZIONI DEL GENE *GYRA*

Minelli F. Dionisi A.M., Carattoli A., Luzzi I.

Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299 00161 Roma

Campylobacter possiede antigeni capsulari termolabili, antigeni flagellari e antigeni somatici termostabili, che permettono una sua differenziazione in diversi sierotipi. La sierotipizzazione costituisce uno strumento epidemiologico importante dal momento che solo alcuni sierotipi sembrano correlati a diarreie invasive gravi con complicanze neurologiche, ma sfortunatamente gli antisieri non sono ancora disponibili in commercio.

La tipizzazione molecolare rappresenta un'ulteriore metodo di indagine utile, anche se non applicabile a livello dei laboratori di microbiologia clinica, per approfondire tutti quegli aspetti epidemiologici relativi al riconoscimento delle fonti di infezione, alle vie di trasmissione e al riconoscimento di specifici fattori di rischio di infezione da *Campylobacter*.

In un lavoro precedente abbiamo osservato che le diverse combinazioni di mutazioni in un tratto del gene *gyrA* (coinvolto nella resistenza ai fluorochinoloni) permettevano di raggruppare ceppi *C. jejuni* di diversa origine. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare la fattibilità di uno schema di tipizzazione basato sulle mutazioni del gene *gyrA*. Dieci ceppi rappresentativi di cinque raggruppamenti sono stati utilizzati per ottenere sieri iperimmuni in topo. I sieri sono stati saggiati mediante Western Blot verso l'LPS dei ceppi omologhi, di ceppi appartenenti allo stesso ed ad altri raggruppamenti.

I nostri risultati preliminari hanno dimostrato che tutti i sieri specifici hanno un'alta reattività verso l'LPS del ceppo omologo e verso quelli appartenenti allo stesso raggruppamento, mentre non si osservano cross-reazioni verso altri raggruppamenti.

Questo studio potrebbe rappresentare un valido approccio per lo sviluppo di una metodica di tipizzazione (Western Blot, Elisa) facilmente eseguibile in laboratori di primo livello.

G069

UTILIZZO DI SEQUENZE GENICHE SPECIE-SPECIFICHE PER DIFFERENZIARE *MYCOBACTERIUM BOVIS* DA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

Paglia M.G., De Mori P., Pucillo L.P.

Laboratorio di analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia - Sezione di Microbiologia Molecolare. I.N.M.I. L. Spallanzani, I.R.C.C.S., Roma.

Nel 1995 Rodriguez (1) ha identificato e caratterizzato un frammento di 500 bp nel genoma di *M. bovis*, la cui amplificazione è stata utilizzata per l'identificazione specie-specifica.

ca di *M. bovis*. Nel 1996 Scorpio (2) ha descritto il gene *pncA*, coinvolto nella sensibilità alla pirazinamide. Tutti i ceppi di *M. bovis* fino ad oggi saggiati presentano la stessa mutazione puntiforme (169_{C→G}) in questo gene, non documentata in *M. tuberculosis*. Sfruttando il polimorfismo nucleotidico nel gene *pncA*, è stata utilizzata una PCR allele-specifica per differenziare *M. bovis* da *M. tuberculosis*.

Scopo del lavoro. Verificare la specificità dei due metodi sottoponendo a PCR per il frammento da 500 bp di *M. bovis* e per il frammento da 185 bp del gene *pncA* di *M. tuberculosis* DNA estratti da differenti materiali biologici positivi per *M. tuberculosis* e da isolati clinici di *M. tuberculosis*.

Materiali e metodi. Il DNA è stato estratto da 46 differenti campioni biologici e da 10 isolati clinici di *M. tuberculosis*. *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv sono stati utilizzati per mettere a punto delle due PCR e definirne la sensibilità.

Risultati. Le PCR hanno rivelato la presenza di 10 pg di DNA cromosomale, corrispondente a circa 2000 genomi. *M. bovis* BCG è risultato caratterizzato dalla banda attesa di 500 bp, mentre tutti i campioni biologici sono risultati negativi. *M. tuberculosis* H37Rv è risultato caratterizzato dalla banda attesa di 185 bp, così pure 20/46 (43.4%) campioni biologici e i 10 isolati clinici. Inoltre 4/10 di questi isolati (40%) erano caratterizzati da un secondo prodotto di 500 bp, simile a quello ottenuto amplificando il DNA di *M. bovis* BCG.

Conclusioni. La PCR per *M. bovis*, quando utilizzata su isolato, consente di identificare correttamente tale micobatterio. Poiché alcuni isolati clinici di *M. tuberculosis* hanno conservato la sequenza di 500 bp nel proprio genoma, per una corretta identificazione di specie sembra opportuno introdurre come secondo marcatore il gene *pncA*.

G070

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI *LEGIONELLA* MEDIANTE AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO CON ELETTROFORESI CAPILLARE.

Paglia M.G., Festa A., Frigiotti D., Nebuloso E., Pucillo L.P.

Laboratorio di analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia-Sezione di Microbiologia Molecolare, I.N.M.I. "L. Spallanzani", IRCCS, Roma.

La polmonite è la manifestazione più frequente nell'infezione da *Legionella*, più spesso causata da *L. pneumophila* sierogruppo 1 e 6. Le indagini microbiologiche che ordinariamente prevedono l'isolamento in coltura, la determinazione diretta di antigeni, la documentazione della risposta sierologica, difettano nella capacità di individuare tutte le specie di *Legionella*. Le tecniche di biologia molecolare, di contro, consentono una più rapida ed affidabile diagnosi.

Scopo del lavoro. Determinare la presenza, tramite PCR, del DNA di *Legionella* spp. in campioni biologici diversi di pazienti con polmonite atipica ed applicare un sistema di sequenziamento automatico ad un tratto del gene 16S rRNA al fine di definire la specie di *Legionella*.

Materiali e Metodi. Il DNA batterico di 53 campioni biologici (15 urine, 15 sieri, 22 campioni respiratori, 1 biopsia polmonare) è stato estratto con metodo Qiagen. Un tratto del gene 16S rRNA è stato amplificato, secondo Jonas D. et al. (1995). L'analisi della sequenza nucleotidica del prodotto di amplificazione è stata eseguita dopo purificazione facendo uso di "terminatori" marcati con sostanze fluorescenti mediante il "Big Dye Terminator Sequencing kit v. 3.0" (Applied Biosystem). Gli amplificati così ottenuti sono stati analizzati con il sistema ABI-PRISM 3100. I dati relativi alle sequenze nucleotidiche sono stati confrontati con le sequen-

ze depositate in banca dati.

Risultati. Alla PCR per *Legionella* spp sono risultati positivi 11/53 campioni: 1 urina, 2 sieri, 8 campioni respiratori. Gli amplificati analizzati sono stati identificati correttamente ed a ciascuna specie è stata attribuita una sequenza unica. L'analisi delle sequenze ha consentito di identificare 9 ceppi di *L. pneumophila* e 2 ceppi di *L. bozemanii*.

Conclusioni. Il sequenziamento mediante elettroforesi capillare di un tratto del gene 16S rRNA di *Legionella* spp è un metodo rapido e riproducibile che ha permesso di ampliare la potenzialità identificativa di specie diverse di *Legionella*, utilizzando DNA direttamente estratto da campioni biologici.

G071

ENTEROCOCCI VANCOMICINA-RESISTENTI ISOLATI DAL SANGUE NEL PERIODO 2001-2002: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Stampone L., Fokas S., D'Ancona F., Salmaso S., Pantosti A., Del Grosso M.

Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, 00161 Roma

Obiettivo di questo lavoro è stato caratterizzare ceppi di enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) isolati dal sangue in pazienti ricoverati in ospedali di diverse aree italiane nel periodo 2001-2002 nell'ambito della sorveglianza nazionale sull'antibiotico resistenza AR-ISS. La caratterizzazione prevedeva una PCR multipla per rilevare i geni delle ligasi specie-specifiche e dei determinanti di resistenza alla vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanC1/2*). Le sensibilità agli antibiotici sono state saggiate mediante microdiluizione in brodo usando il pannello Sensititre. Per analizzare le relazioni clonali fra i ceppi, sono stati ottenuti i profili del DNA genomico digerito con *SmaI* mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE). Sono stati caratterizzati 25 ceppi di VRE isolati in 12 differenti laboratori. La PCR multipla ha confermato che 21 ceppi appartenevano alla specie *E. faecium* e 4 alla specie *E. faecalis*. Tutti, tranne uno, portavano il gene *vanA*, mentre un ceppo di *E. faecium* portava il gene *vanB*. La sensibilità agli antibiotici eseguita su 21 VRE *E. faecium* mostrava che tutti i ceppi erano resistenti all'ampicillina, la maggioranza erano anche resistenti ad alti livelli di streptomicina (20/21) e gentamicina (19/21). Il ceppo *vanB*-positivo è risultato sensibile sia alla streptomicina che alla gentamicina. Cinque ceppi erano resistenti alla tetraciclina e uno al quinupristin-dalfopristin. La genotipizzazione mediante PFGE ha dimostrato che la maggioranza degli isolati aveva profili molto simili, differendo fra di loro per un numero di bande compreso tra 1 e 4. In conclusione, in Italia come nel resto d'Europa la maggioranza dei VRE appartengono alla specie *E. faecium* e portano il gene *vanA*. Per la prima volta nel nostro paese è stata rilevata la presenza di un isolato portatore del gene *vanB*. Dall'analisi genotipica si può ipotizzare una origine clonale dei ceppi VRE *E. faecium* circolanti in diversi ospedali e aree italiane.

G072

INFEZIONI NOSOCOMIALI IN NUCLEO PER STATI VEGETATIVI PERMANENTI

D'Angelo R., Fogato E., Balzaretto M., Barletta G., Grillo A.

Ist. Geriatrico P. Redaelli - Milano

Lo stato vegetativo permanente (SVP) è un condizione clinica caratterizzata da perdita della consapevolezza di sé e dell'ambiente, mantenimento di un certo grado di vigilanza, conservazione delle funzioni vitali. Dati i molteplici fattori di rischio, le infezioni rappresentano uno dei principali problemi clinici di questi pazienti, siano essi degenti in ospedale o in RSA (Tresch, 1991). Scopo dell'indagine era applicare uno strumento adatto alla sorveglianza delle infezioni in un nucleo SVP; rilevarne l'incidenza, insieme con alcuni dati epidemiologici, al fine di orientare la politica igienico-sanitaria nei confronti di questo tipo di unità di degenza. Abbiamo quindi applicato i criteri di Mc Geer A. et al. (1991), modificati per renderli adattabili a pz non in grado di riferire alcuna sintomatologia soggettiva, agli ospiti del nucleo SVP dell'Ist. Geriatrico P. Redaelli di Milano dal 25.10.02 (data di accoglimento del primo pz) al 30.04.03. Nel periodo di tempo considerato sono stati accolti nel nucleo 9 soggetti (5 F 4 M), per complessivi 762 giorni di degenza, di età compresa tra 42 e 81 aa., dei quali 9 portatori di catetere vescicale a dimora, 8 di PEG, 1 di sondino naso/gastrico, 6 di tracheostomia, 2 di catetere venoso periferico, 1 di catetere venoso centrale; 6 erano affetti da ulcere da pressione, 4 assumevano antiacidi (anti H2 o inibitori della pompa protonica). L'SVP era conseguenza in 3 casi di stato postanossico da arresto cc, in 2 di ictus ischemico, in 2 emorragico, in 1 di encefalopatia spongiforme, in 1 di meningioma. Durante il periodo di sorveglianza sono stati rilevati, secondo i criteri sopra citati, 21 episodi infettivi (27.6/1000gg.pz.): 6 a carico delle vie urinarie, 4 delle basse vie respiratorie, 2 polmoniti, 4 di cute e tessuti molli (ulcere infette), 3 gastrointestinali (diarrea in presenza di tossina A del *C.difficile*), 1 congiuntivite, 1 episodio febbrile non spiegato. Oltre ai 3 casi con presenza di Tossina A, sono stati identificati 13 isolati, in prevalenza Gram negativi (9), tra i quali 3 *Pseudomonas aeruginosa* e 2 *Proteus mirabilis* (1 produttore di ESBL); 2 *Staphylococcus aureus* oxacillina resistente; 2 *Candida* spp. In conclusione, lo strumento si è rivelato utile per la sorveglianza delle infezioni in un nucleo SVP; l'incidenza riscontrata è, come ci si poteva aspettare, decisamente elevata rispetto ai dati comunemente rilevati nelle RSA (1.5-13.97) e a quello precedentemente rilevato nella nostra stessa RSA (4.35). Ci proponiamo quindi, al fine di ridurre il tasso di incidenza, dato che i fattori di rischio propri del paziente sono difficilmente eliminabili, di concentrare l'attenzione sull'educazione degli operatori alla prevenzione delle contaminazioni crociate con il lavaggio delle mani, l'uso di indumenti sterili, la disinfezione e la sterilizzazione degli strumenti; sulla politica degli antibiotici; su un controllo più rigoroso dell'accesso al reparto.

G073

DISTRIBUZIONE DEI PRINCIPALI PATOGENI ISOLATI DA INFEZIONI DEL SITO CHIRURGICO NEL TRIENNIO 2000-2002.

Gualterotti S., Giuffrè V.

P.O. Bassini- Azienda Ospedaliera S. Gerardo di Monza

Scopo della presente indagine è monitorare le infezioni della ferita chirurgica, seconde in ordine di frequenza tra le infezioni ospedaliere. A questo proposito è stata operata una review degli isolamenti degli ultimi tre anni da materiali (tamponi da ferita, drenaggi, ecc.) riconducibili ad una infezione del sito chirurgico.

S. aureus, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis* (o Stafilococco coagulasi negativo) risultano sempre tra i microorganismi più frequentemente isolati, sia pure con percentuali variabili da un anno all'altro, in accordo con i dati rilevati dal NNIS in diversi periodi (1986, 1996).

Di questi microorganismi è stata, inoltre, presa in esame la suscettibilità agli antibiotici: a questo scopo sono state confrontate le percentuali di sensibilità agli antibiotici saggiati nei tre anni dello studio. Non sono state rilevate differenze significative, ad eccezione di una generica diminuzione di sensibilità di *S. aureus* e di un marcato incremento della meticillina-resistenza.

Si conferma pertanto l'opportunità di monitorare le resistenze dei ceppi di origine ospedaliera al fine di stabilire opportuni modelli di terapia e di profilassi.

G074

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE CON AFLP DI PAERUGINOSA ISOLATI DA PAZIENTI TRAPIANTATI DI MIDOLLO OSSEO

Guidi S*, Fanci R*, Bosi A*, Casalone E**, Mengoni A**, Mastromei G**, Pecile P***, Cecconi D.***, Nicoletti P.***

*Cattedra e U.O.Ematologia A.O. Careggi, Università di Firenze,

**Dipartimento di Biologia Animale e Genetica,

Università di Firenze - C.I.B.I.A.C.I.,

***Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. Careggi, Firenze

Le infezioni da *P. aeruginosa* continuano ad avere elevata morbilità e letalità nell'immunodepresso costituendo una delle principali cause di infezione nosocomiale.

Dall'ottobre 2001 al giugno 2002 nel reparto di Trapianto di Midollo Osseo della A.O. Careggi sono stati registrati 6 casi di sepsi da *P.aeruginosa* in 6 pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo (3 allotrapianti, 2 da donatore non familiare, 1 da sangue placentare). Gli stipiti isolati risultavano fenotipicamente uguali (stesso profilo biochimico, stesso pattern di sensibilità agli antibiotici) facendo sorgere il sospetto di una possibile trasmissione ospedaliera e in particolare dall'ambiente poiché da indagini retrospettive è emerso che i 6 pazienti avevano occupato, nel tempo, le stesse stanze (stanze Q ed I). Sono stati eseguiti controlli microbiologici ambientali e dopo un primo screening l'indagine si è concentrata sui bagni relativi alle due stanze sopra menzionate dai quali sono stati isolati ceppi di *P.aeruginosa* fenotipicamente uguali a quelli isolati dai pazienti.

Al fine di verificare una fonte unica di infezione, 15 ceppi isolati da emocultura e dall'ambiente, e il ceppo ATCC 27853 di *P. aeruginosa*, sono stati sottoposti a tipizzazione

molecolare mediante analisi AFLP. I profili di amplificazione sono stati analizzati utilizzando un sequenziatore automatico e confrontati tra loro con il software di analisi GelCompar 3.0.

L'analisi molecolare suddivideva i quindici isolati in 3 gruppi genetici con similarità $\geq 84\%$: 1) 4 ambientali, 2) 1 da paziente, 3) 5 da pazienti e 5 ambientali. Questi dati indicano che i ceppi patogeni isolati da almeno cinque pazienti hanno un'origine comune tra loro e con alcuni ceppi isolati dai bagni da loro condivisi nel tempo.

Nel loro complesso, i risultati delle analisi epidemiologiche, fenotipiche e molecolari avvalorano l'ipotesi della fonte unica di infezione e non escludono una via di trasmissione ambientale. Le due stanze preventivamente chiuse, sono state successivamente bonificate.

G075

MICROBIOLOGIA CLINICA DEI PAZIENTI RICOVERATI NEL REPARTO DI RIANIMAZIONE NEL BIENNIO 2001-2002

Pieretti B.⁽¹⁾, Moretti M.⁽¹⁾, Ghiandoni MG.⁽¹⁾, Ciaschini G.⁽¹⁾, Baldassarri M.⁽²⁾, Fabi MG.⁽²⁾, Faccenda G.⁽³⁾, Delprete E.⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratorio Analisi, ⁽²⁾ U.O. Anestesia e Rianimazione, ⁽³⁾ Direzione Sanitaria, Ospedale S. Croce, ASL N°3, Fano (PU)

Il reparto di Rianimazione del nostro Ospedale ha effettuato 543 ricoveri nel biennio 2001-2002. Le richieste per analisi microbiologiche inviate in tale periodo al Servizio di Laboratorio sono state: 2308 urinocolture, 304 emocolture e 872 esami culturali su broncoaspirato.

Urine e broncoaspirati sono stati seminati direttamente sui rispettivi terreni di crescita, mentre le emocolture raccolte negli appositi flaconi sono state incubate per un periodo massimo di 7 giorni (sistema Bact/ALERT 120, Organon Teknika), dopo il quale in assenza di crescita sono state considerate negative.

I campioni risultati positivi sono stati sottoposti a identificazione del microrganismo e valutazione dell'antibiogramma tramite sistemi automatizzati (Vitek, bioMérieux) o in alternativa con metodo manuale (gallerie API e Kirby Bauer).

L'analisi dei risultati è servita per valutare i seguenti aspetti:

- incidenza dei microrganismi isolati in relazione al numero di posti letto e ricoveri per anno,
- tipo e frequenza degli isolati nei vari materiali,
- associazione fra microrganismi,
- antibiotico resistenza e variazioni nel tempo delle resistenze degli isolati nel paziente e nel reparto,
- valutazione degli isolati da diversi materiali nello stesso paziente,
- confronto dei risultati rispetto agli altri reparti di degenza e/o pazienti non ospedalizzati.

In generale lo scenario microbiologico riscontrato nel reparto di Rianimazione non sembra essere significativamente diverso dalle altre realtà ospedaliere per tipologia, frequenza e sensibilità dei microrganismi isolati. Questo a conferma di una buona gestione clinico-terapeutica del paziente critico frutto anche dell'elaborazione e applicazione di un "Protocollo per l'utilizzo razionale degli antibiotici in Rianimazione" redatto in collaborazione fra il Reparto e la Direzione Sanitaria.

Si evidenzia solo in taluni casi e per pazienti particolarmente compromessi e con lunghe degenze la comparsa di fenomeni di antibiotico resistenza.

G076

SORVEGLIANZA DELLA COLONIZZAZIONE DA *L.PNEUMOPHILA* DELL'IMPIANTO IDRICO DELL'OSPEDALE MAGGIORE DI MILANO

Ranzi M.L., Grancini A., Malighetti V., Perego L., Musitelli M., Lenza A.R., Colucciello M.*

Lab. Centrale di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia - IRCCS Ospedale Maggiore - Milano; * Dir. Sanitaria IRCCS Ospedale Maggiore - Milano

Come indicato dalle linee guida ministeriali per la prevenzione e il controllo della legionellosi del 5/5/2000, è stato implementato un protocollo di sorveglianza per il monitoraggio della colonizzazione dell'impianto idrico ospedaliero. Da settembre 2001 a maggio 2003 abbiamo effettuato 380 prelievi dai bollitori e dai punti periferici della rete idrica nei reparti di degenza e nelle sale operatorie di 13 padiglioni dell'ospedale.

Il protocollo prevede che se al primo prelievo la carica batterica è:

$< 10^2$ CFU/L si eseguano un secondo e un terzo prelievo rispettivamente dopo 2 e 6 mesi

compresa tra 10^2 CFU/L e 10^3 CFU/L si eseguano un secondo e un terzo controllo rispettivamente dopo un mese e 3 mesi (se la carica si riconferma 10^2 CFU/L il terzo controllo si effettua invece dopo un mese)

$\geq 10^3$ CFU/L si proceda a bonifica mediante iperclorazione e successivo controllo batteriologico, mediamente dopo 10 giorni.

Sono risultati positivi 101 campioni (26.6%), di cui 71 (70.3%) con carica $\geq 10^3$ CFU/L.

Il controllo effettuato dopo bonifica ha dato esito negativo nel 84.7% dei prelievi; i prelievi positivi hanno mostrato un decremento della carica compreso tra 1 e 3 ordini di grandezza.

Il 94% dei ceppi isolati è di sierotipo 2-14, solo il 6% è di sierotipo 1.

Il protocollo utilizzato è oneroso per le risorse economiche e umane richieste, ma si rivela efficace nel ridurre la carica batterica e quindi il rischio di infezione. Pur essendoci infatti una popolazione di pazienti ad elevato rischio infettivo (ematologici e trapiantati d'organo) non si sono verificate infezioni ospedaliere da *Legionella pneumophila* nel periodo di sorveglianza.

G077

ISOLAMENTO DI *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* DA CAMPIONI AMBIENTALI: L'ESPERIENZA DELL'AZIENDA OSPEDALIERA SAN CAMILLO FORLANINI DI ROMA.

Minniti RR*, Tronci M*, Sodano L**, Ricci ML***, Fioriello C**, Iannone P*.

*Laboratorio di Microbiologia Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini. **Servizio Infezioni Ospedaliere Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Via Portuense 332 Roma; *** Laboratorio Batteriologia e Micologia Medica, ISS v.le Regina Elena Roma

Obiettivi: In seguito al verificarsi, presso l'Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini di Roma, di due casi di legionellosi nosocomiale, uno verificatosi il 07-10-2002 e uno il 26-11-2002, diagnosticati, l'uno con l'isolamento del

ceppo e la positività dell'antigene solubile urinario, e l'altro solo con la positività dell'antigene, il CIO dell'Azienda ha deciso di attuare un programma di sorveglianza sanitaria che prevede un'indagine ambientale per la ricerca del germe nel circuito idrico sanitario dell'Azienda per valutare lo stato di colonizzazione.

Materiali e Metodi: Il programma, attuato secondo le linee-guida per la prevenzione e controllo della legionellosi emanate dalla Conferenza Stato Regioni il 04/04/2000, è iniziato ad ottobre 2002 e prevede l'esecuzione di campionamenti ambientali sino ad Ottobre 2003. Nei mesi di Ottobre-Aprile sono state campionate le acque prelevate da rubinetti e docce di 38 reparti clinici. Ogni campionamento ha previsto il prelievo di 1L di acqua flambato a livello del punto di sbocco (per valutare la colonizzazione dell'impianto) e di 1L di acqua non flambato per valutare la carica effettiva in condizioni di utilizzo. I campioni di acqua sono stati processati presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda, attuando il protocollo di ricerca indicato dall'ISS.

Risultati preliminari: Su 38 reparti, 24 sono risultati colonizzati da *Legionella pneumophila*; 14 sono risultati negativi. Dai 24 reparti positivi, in 16 è stata isolata *Legionella pneumophila* sierogruppo 2-14 (*Legionella latex* Oxoid) con carica batterica di 1.000 UFC/L; in 1 è stata isolata *Legionella pneumophila* sierogruppo 2-14 con carica batterica di 100.000UFC/L; in 5 reparti è stata isolata *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 con carica batterica di 100.000UFC/L.

Conclusioni: Quando vengono riscontrati casi di malattia da *Legionella*, effettuare controlli ambientali è opportuno. I risultati di questo articolato programma di sorveglianza, che continuerà sino ad Ottobre del 2003, consentiranno di valutare il grado di colonizzazione esistente nella rete idrica dell'azienda ed un'indagine epidemiologica dei risultati ottenuti permetterà di definire linee guida aziendali finalizzate a valutare l'opportunità di effettuare interventi di bonifica.

G078

INFEZIONI BATTERICHE ED ANTIBIOTICO - RESISTENZA NELLE ULCERE CUTANEE: 5 ANNI DI OSSERVAZIONE (1998 - 2002).

De Leo C., Somma M.C., Cappotto F., Dore I.A., De Carlo M.

Istituto Dermatopatico dell'Immacolata - IDI, I.R.C.C.S. - via Monti di Creta 104, 00167 Roma

Obiettivi Ulcere cutanee distrofiche, a differente etiologia, sono spesso caratterizzate, soprattutto nell'anziano, da una scarsa tendenza alla guarigione spontanea e da un alto rischio di recidiva e gravi complicazioni. Perciò abbiamo determinato tipi e frequenze di specie batteriche coinvolte nelle infezioni di 1378 ulcere cutanee di pazienti ospedalizzati presso l'IDI - IRCCS, di Roma, nel quinquennio 1998 - 2002, valutandone l'antibiotico-resistenza, soggetta a variazioni in base a fattori ambientali e terapeutici.

Metodi Esame colturale per germi comuni ed identificazione biochimica con antibiogramma mediante SCEPTOR (Beckton Dickinson).

Risultati 1378 ulcere nosocomiali sono risultate tutte infette e quasi sempre a carattere polimicrobico. Principali cause: *St. aureus* (25%), *Ps. aeruginosa* (25%), *Enterobacteriaceae* (20%), *Str. faecalis* (15%), *Str. β-emolitico* (9%), *St. epidermidis* (6%). I trend di infezioni hanno subito variazioni nel quinquennio in esame. L'antibiotico-resistenza dei patogeni

isolati, causanti infezioni ospedaliere, ha registrato i seguenti incrementi:

- MRSE (Methicillin-Resistant *St. epidermidis*) da 17% a 67%;
- MRSA (Methicillin-Resistant *St. aureus*) da 13% a 48%;
- VRE (Vancomycin-Resistant *Enterococchi*) da 6% a 20%;
- "Enterobacteriaceae ESBL (Extended-Spectrum Beta-Lactamases) da 0% a 10.5%;
- MRPA (Multi-Resistant *Ps. aeruginosa*) resistente ad almeno 2 fra Ceftazidime, Amikacina, Imipenem, da 27% a 42%;
- MRBHS (Multi-Resistant *beta-hemolytic Streptococchi*) resistente ad almeno 2 fra Penicillina, Imipenem, Ampicillina, da 7% a 32%.

Conclusioni I risultati evidenziano l'importanza del monitoraggio dell'antibiotico-resistenza nelle ulcere cutanee nosocomiali, poichè contribuisce all'assicurazione di qualità mediante ottimizzazione delle terapie e dei protocolli di gestione di tali patologie.

G079

DERMATOLOGIA ED INDAGINI DI LABORATORIO : ITTIOSI IN GRAVIDANZA.

Di Fabio A.M.; Colangeli M.S.Varrassi S.

A.S.L. 04 - L'Aquila . U.O. di Patologia Clinica

L'ittiosi è una malattia ereditaria legata a turbe enzimatiche, a trasmissione autosomica dominante o recessiva.

Compare entro 3 mesi -3 anni e dura tutta la vita.

Le squame cutanee possono essere di colore biancolucido sottili (ittiosi nitida) o di colore variabile tra il grigio ed il nerastro (ittiosi nigricans). Nel paziente ittioso sono state riscontrate turbe ormonali quali ipotiroidismo, ipogenitalismo, iposurrenalismo ed infertilità.

Scopo del nostro lavoro è la descrizione di un caso insolito di giovane donna con ittiosi in gravidanza.

Materiali e metodi.

Nel mese di luglio 2002 è pervenuta presso il nostro laboratorio una donna di trentaquattro anni con ittiosi (diagnosticata all'infanzia) per effettuare i normali controlli in gravidanza.

All'esame obiettivo presentava squame di colore biancolucido simili alle scaglie dei pesci localizzate nelle sedi tipiche: gomiti e ginocchia.

La paziente è stata da noi seguita durante tutto il periodo gestazionale fino al momento del parto, rispettando la cadenza temporale dei controlli dettata dal suo ginecologo.

I livelli sierici di Beta - hCG (dosati con apparecchio ARCHITECT della ditta Abbot) come nella gravidanza fisiologica aumentavano rapidamente durante le prime fasi della gestazione e decrescevano dopo 80 giorni, dimostrando una normale sovrapposizione delle attività biologiche delle subunità Beta di hCG, LH e TSH. I parametri ematochimici relativi alle varie fasi gestazionali erano normali, incluso una evidente emodiluizione.

Discussione e conclusioni

Per quanto l'ittiosi sia una dermatosi ereditaria associata spesso a ipotiroidismo, ipogenitalismo, ipocorticosurrenalismo ed infertilità; la paziente da noi seguita non ha mostrato particolari turbe ormonali durante tutto il periodo gestazionale fino al momento del parto. Il bambino è nato a termine sfidando tutti i presupposti scientifici riportati in letteratura.

G080

RIORGANIZZAZIONE E IMPLEMENTAZIONE DI UN SETTORE DI BIOLOGIA MOLECOLARE IN MICROBIOLOGIA

Garlaschi M.C.*, Garlaschi M.L.*, Restelli A.*, Bonamore R.*, Cariani L.*, Scarazatti E*.

*U.O. Microbiologia, Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano

Introduzione

L'Azienda Ospedaliera Istituti Clinici di Perfezionamento, è un Ospedale di rilievo nazionale e di alta specializzazione, convenzionato con l'Università degli Studi di Milano. La specializzazione materno infantile si estrinseca in una serie di reparti e servizi rivolti alla tutela della salute, intesa come benessere fisico, psichico e sociale, della mamma e del bambino.

Il progetto prevede la riorganizzazione e la implementazione del settore di biologia molecolare che fa parte del laboratorio di microbiologia.

Obiettivo e fattibilità dello studio

Il progetto comprende lo sviluppo di due protocolli separati (A e B).

Il protocollo A si pone come obiettivo quello di offrire al clinico strumenti di diagnosi più completi.

Il protocollo B si pone come obiettivo quello di approfondire lo studio delle infezioni nosocomiali.

I test diagnostici che ci si propone di sviluppare sono:

- i test per la diagnosi di polmonite da *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella pneumophila*, nei materiali provenienti dalle alte e basse vie respiratorie.
- i test per la ricerca del Papillomavirus, Herpes virus e *Chlamydia trachomatis*, segnalati in letteratura sia come possibili agenti patogeni di infezioni sessualmente trasmesse sia per il loro legame con l'insorgenza di forme tumorali dell'apparato genitale femminile.
- i test per l'evidenziazione di patogeni nelle meningiti batteriche e virali.
- il test di ribotipizzazione molecolare del DNA batterico per una corretta indagine epidemiologica.

Lo studio di fattibilità del progetto riguarda l'acquisizione di spazi appropriati, di fondi per la strumentazione e per i reagenti e di personale dedicato. Il tempo per la realizzazione del progetto è stimato in 15-20 mesi.

Si stima che il pareggio di bilancio (break even) verrà raggiunto in due anni.

G081

SCHIZOMICETI ISOLATI NELLE OSTRUZIONI CONGENITE DEL DOTTO NASOLACRIMALE

D'Amelio S., Giardini F., Pollino C., Indovina L.

Ospedale Oftalmico di Torino "Divisione di Oftalmologia Infantile" - "Laboratorio Analisi"
Via Juvarra 19, Torino.

Scopo: individuare gli agenti batterici patogeni nei casi di stenosi congenita del dotto naso-lacrimale (SCDN) nei neonati e nella prima infanzia.

Metodo: abbiamo esaminato una serie consecutiva di 57 pazienti, di età compresa tra 1 mese e 2 anni, giunti alla nostra osservazione nell'arco di un anno (maggio 2002-maggio 2003).

Ad ogni paziente è stato praticato l'esame colturale congiuntivale con un tamponcino di calcio alginato sterile, monouso, previamente imbibito di soluzione fisiologica sterile, passando più volte nel fornice congiuntivale inferiore. Il tampone quindi veniva seminato su piastra di Agar Cioccolato + Vitox + Bacitracina per la ricerca anche di germi in microaerofilia come *Haemophilus*; su piastra Agar Cioccolato semplice da incubarsi in aerobiosi; su piastra di Agar Sangue Columbia per *Streptococcaceae* e *Streptococcus pneumoniae*. Dopo un'incubazione di 48h a 37°C avveniva la lettura e l'identificazione mediante tecniche biochimiche e colorazione GRAM.

Per ciascun ceppo isolato è stato eseguito l'antibiogramma con il metodo Kirby Bauer:

Risultati: 5 casi di coltura negativa; nei 52 casi restanti sono stati isolati in totale 79 ceppi patogeni tra i quali i più frequentemente riscontrati sono *Streptococcus pneumoniae*, 26 ceppi isolati (33%); *Haemophilus* 10 ceppi (11%); *Streptococcus alfa-emolitico* 16 ceppi (20%).

E' significativa la presenza di flora patogena mista nella percentuale del 20%.

Conclusioni: la SCDN è una condizione mono o bilaterale che impedisce in maniera parziale o totale il normale deflusso delle lacrime dal fornice congiuntivale al rinofaringe.

Il ristagno lacrimale favorisce le sovrainfezioni batteriche.

L'individuazione dei ceppi più frequentemente coinvolti e la loro sensibilità agli antibiotici forniscono un aiuto ad Oftalmologi e Pediatri per una corretta antibiotico-terapia.

G082

SIEROIMMUNOLOGIA: DAL DATO ANALITICO AL REFERTO

Martelli P., De Luca R., Crovatto M., Modolo M.L., Villalta D., Reitano M., Cappelletti P.

S.O.S Immunologia clinica e Virologia. Dipartimento di Medicina di Laboratorio
Azienda Ospedaliera Santa Maria degli Angeli Via Montereale Pordenone

Scopo del laboratorio è produrre referti corretti, in tempi adeguati, non ambigui e clinicamente utili. Eventuali commenti interpretativi sono parte essenziale del suo ruolo e dovrebbero essere chiari, succinti e non ambigui (Clinical Pathology Accreditation UK).

Al contrario il referto microbiologico è talora incerto e riflette quella che è la realtà clinica e biologica e non necessariamente rappresenta la risposta definitiva o comunque il prodotto terminale del lavoro.

Si rende pertanto necessario completare quanto ottenuto dalla ricerca richiesta con opportuni commenti che concretizzino un'azione di consulenza e consiglio al Clinico.

Essi infatti possono evitare un'interpretazione non corretta del dato, indirizzare verso eventuali ulteriori percorsi diagnostici e non necessariamente possono rispondere in tutto ai criteri stabiliti dal CPA: se è vero infatti che dovrebbero essere di facile utilizzo, usare termini semplici e dare notizie clinicamente rilevanti, non sempre possono essere succinti o esaurienti.

Più volte è stato preso in considerazione e discusso il ruolo cruciale del Batteriologo nel flusso bidirezionale medico/caso clinico/riciesta ↔ laboratorio /referto, non altrettanto è stato fatto nel caso di altri settori del laboratorio, in sieroimmunologia in particolare.

Questa riveste ancora oggi un ruolo diagnostico fondamentale e non sostituibile in molte patologie infettive di primaria

importanza (infezioni da HIV, Epatiti, Borreliosi, Infezioni in gravidanza , Sifilide ecc.).

Anche in questo campo, l'interpretazione corretta di quanto ottenuto è la somma dei dati clinici del paziente più l'esperienza e la conoscenza delle tecniche, del microrganismo in causa, della epidemiologia, della infezione e della sua storia naturale, della risposta immune e delle possibili variabili a questa connesse. Lo scopo del lavoro quindi diviene ben più ampio che produrre un semplice dato anche se accurato e l'opinione di un esperto adeguata al caso specifico è difficilmente sostituibile da commenti fissi generati automaticamente dal computer.

A supporto di quanto affermato, si riportano pertanto referti già prodotti che documentano come spesso possa essere decisivo il contributo interpretativo come momento importante nella trasformazione del dato analitico in vero referto. I commenti in alcuni casi possono in modo chiaro, conciso e definitivo permettere di rispondere al quesito clinico. In altri casi, pur lasciando spazio all'incertezza o, meglio, a possibilità diverse, possono fornire comunque l'indirizzo per ulteriori indagini e approfondimenti sulla base dei quali raggiungere con maggior probabilità di successo una diagnosi corretta e, se necessario, un iter terapeutico più incisivo. In particolari circostanze infine si ampliano fino a rappresentare vere e proprie lettere al Curante, che ancora una volta testimoniano il compito fondamentale del Microbiologo nella pratica clinica.

G083

VALORE PREDITTIVO DEI FRAMMENTI CAGA, VACA E UREASICO IN UN TEST COMMERCIALE WESTERN BLOT PER H.PYLORI IGG.

Meledandri M., Ballardini M., Spagnesi L., Maiorano S., Cattivelli M., Evangelisti M.E.

U.O.C. Microbiologia e virologia A.C.O. S.Filippo Neri, Via Martinotti 20, 00135 Roma.

Obiettivi. Valutare la risposta IgG contro diversi frammenti di *H.pylori*, al fine di determinare la predittività dei singoli antigeni rispetto alla risposta contro l'intero lisato batterico.

Metodi. Revisione dei test per *H.pylori* effettuati tra il 1996 e il 2001 (1838 pazienti ambulatoriali sottoposti a Western Blot, per la ricerca delle IgG).

Mediante Helico Blot 2.0 (Genelabs™) sono state evidenziate le IgG contro i frammenti 19.5 Kd, 26.5 Kd (ureasi sub.A), 30 Kd, 35 Kd, 89 Kd (VacA), 116 Kd (CagA). A ciascuna delle bande è stato attribuito un punteggio (*score*), da 1+ a 4+, riferito alla reattività del controllo positivo.

Risultati. La popolazione ha presentato una prevalenza di *H.pylori* IgG pari al 76% (69% di positivi risolti; 7% di indeterminati).

Il punteggio medio (*mean score*) dei campioni reattivi è stato così ripartito, per ogni banda: 116Kd->2793; 26.5Kd->2121; 30.0Kd->1897; 35.0Kd->1381; 19.5Kd->1276; 89.0Kd->1034. Lo *score* ha fatto risaltare l'eterogeneità della risposta (i valori massimi sono stati associati ai frammenti CagA e ureasico).

I campioni moderatamente reattivi hanno mostrato una prevalenza relativa delle IgG contro le bande 19.5, 26.5 e 30.0 (rispettivamente 45%, 51% e 47% dei positivi).

I campioni fortemente positivi hanno mostrato una prevalenza relativa delle IgG contro la banda CagA (51% dei positivi).

Rispetto ai positivi risolti (criteri Genelabs™), sono state determinate la sensibilità, la specificità, il potere predittivo positivo (PPV) e negativo (NPV) delle bande.

	Sensibilità	Specificità	PPV	NPV
B19.5	51%	74%	86%	32%
B26.5	71%	71%	89%	44%
B30.0	65%	72%	88%	39%
B35.0	42%	76%	85%	29%
B89.0	41%	69%	80%	27%
B116	71%	70%	88%	43%

Conclusioni. Le IgG contro le regioni CagA, VacA e ureasi non sono in grado, singolarmente, di individuare con efficacia l'avvenuta infezione da *H.pylori*.

G084

GR. C E G NELLA FREQUENZA DI ISOLAMENTO DI STREP. B. EMOL. DI T. FARINGEO DI PAZ. AFFERENTI AL LAB. ANALISI FASANO (BR).

Muolo V., Ostuni A.M., Lisi L., *Mosca A., Vinci E.

Dipartimento Medicina di Laboratorio AUSL BR/I, Via Nazionale dei Trulli, 72015 Fasano (BR).

*Sezione di Microbiologia, Dipartimento MIDIM, Università degli Studi di Bari

Obiettivo

Streptococcus pyogenes è il principale responsabile di faringotonsillite soprattutto in età pediatrica e scolare. Tuttavia altri *Streptococchi* beta emolitici di gruppo C e G sono ritenuti potenziali agenti di faringotonsilliti recidivanti; inoltre possono determinare aumento del TAS. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutarne l'incidenza nel nostro territorio, essendo queste faringotonsilliti batteriche spesso sottovalutate o misconosciute dal medico.

Materiali e metodi

Sono stati presi in considerazione 866 tamponi faringei da soggetti pediatrici ospedalizzati e ambulatoriali eseguiti nel periodo Gennaio 2001-Maggio 2003. Il tampone faringeo è stato seminato su agar sangue-CNA con aggiunta di dischetto di Bacitracina ed incubazione in anaerobiosi. Le colonie beta-emolitiche sono state identificate utilizzando il test al lattice (Streptococcal Group Kit, OXOID).

Risultati

I tamponi faringei eseguiti sono stati 866, di cui 52 (6,0%) positivi per SBEA, 50 (5,8%) positivi per SBEC e 2 (0,2%) positivi per SBEG.

Conclusioni

I nostri dati indicano che la frequenza di isolamento dello SBEC è pari a quella dello SBEA, mentre la frequenza di isolamento dello SBEG è non significativa rispetto a quella di SBEA e SBEC.

Riteniamo pertanto utile segnalare l'eventuale presenza di questi microrganismi per indirizzare il medico verso una diagnosi di faringotonsillite batterica.

G085**CHLAMYDIA TRACOMATIS AND MALE INFERTILITY**

Picerno A., Ferri A., Pafundi V., Smaldore G.

U.O. Diagnostica di Laboratorio Azienda Ospedaliera Ospedale S. Carlo- Potenza

Research on sexually transmitted diseases has recently started taking into account the ever growing epidemiological importance of chlamydia t., which is one of the causes of complex diseases (e.g. salpingitis and prostratitis) and of sterility, and is therefore to be considered as a social problem. The seminal fluid of 600 patients suffering from urogenital diseases or with a suspicion of sterility has undergone traditional microbiological analysis; analyses have also been carried out in order to detect Chlamydia t.'s antigens by means of IFA method, and to detect secretory IgA anti-Chlamydia t. by means of ELISA. The same tests have been performed both in the urethral secretion and in order to detect the presence IgG and IgA antibodies in the serum. 50 patients resulted positive to secretories-IgA, without showing any evident symptoms; 7 of these were ct's antigen positive and only two patients resulted positive to chlamydia t. in the seminal fluid with alteration of serum parameters. Our experience has pointed out that one can fail to detect the infection even when the antigen is present in the urethral secretion. Therefore, studies on chlamydia t must include multi-parametric analysis in order to understand to extent of the infection. The disappearance of chlamydial markers after appropriate therapy and the improvement in the morpho-kinetic parameters of the seminal fluid all testify the role chlamydia t. has in the etiology of diseases related to fertility. Thus, a good screening performed by means of reliable diagnostic methods and non-invasive techniques is extremely important, as it makes the detection and therefore the treatment of most of the cases possible.

References: Schachter J., Evolution of diagnostic tests Chlamidia trachomatis infections. Third Meeting of Eur. Soc. For Chlamydia Res., Wien sept. 1996.

G086**STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE ALLA METICILLINA IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA**

Grassi P., Grasso E., Sciuto C.*, Trapanotto G., Lombardo A., Mazzurco A., Dimitriou A., Sciacca A.

Laboratorio analisi Azienda Policlinico

*DH Pneumologia Dipartimento di Pediatria
Università Catania

Lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) rappresenta una delle principali cause di infezioni in pazienti con gravi patologie. Il diffondersi della meticillina resistenza tra i vari ceppi di *Staphylococcus*, è ormai riconosciuta come un'emergenza a livello mondiale soprattutto in ambito ospedaliero dove si assiste contemporaneamente a una multi-resistenza verso altre molecole (macrolidi, aminoglicosidi, chinolonici). L'identificazione non è sempre facile dato che alcuni ceppi esprimono la resistenza solo in condizioni di crescita particolari.

Scopo della nostra indagine è stato quello di valutare l'inci-

denza di MRSA negli escreti di 80 pazienti con fibrosi cistica ricoverati presso il reparto di pneumologia o afferenti per i controlli periodici al Dh pneumologia del Dipartimento di Pediatria di Catania dal 1996 a oggi. L'età media dei pazienti, nei vari anni non è costante, varia da 15 anni a 10 anni. L'escreto, inviato immediatamente in laboratorio, dopo fluidificazione è stato seminato su terreni selettivi e di arricchimento per la ricerca dei comuni e potenziali patogeni. L'identificazione dei ceppi di *Staphylococcus* e i relativi antibiogrammi sono stati effettuati mediante sistema automatizzato vitek bioMerieux. La meticillina resistenza è stata sempre confermata con il test di diffusione in agar Muller-Hinton NaCl 2% e il dischetto di oxacillina (6µg/ml). I ceppi isolati negli ultimi due anni sono stati contemporaneamente saggiati con altri sistemi automatici in commercio (Becton Dickinson).

Nel periodo preso in esame sono stati isolati 341 ceppi di *Staphylococcus aureus*.

Nella tabella viene riportata la percentuale di resistenza alla meticillina

anno	96	97	98	99	2000	01	02	03
n° staf. aurei	8	54	38	30	23	67	88	44
% vitek	/	52	37	40	57	40	30	30
% M.Hinton	/	39	34	36	43	30	26	14

Le percentuali di resistenza variano nei vari anni, raggiungendo un massimo nel 2000.

Negli anni successivi si assiste ad una lieve riduzione infatti il costante aumento delle % di resistenza e dei pazienti in cui si isolano ceppi resistenti è stato motivo di attenzione nella scelta della terapia antibiotica ma soprattutto tale riscontro ha fatto attuare tutte le procedure per ridurre i momenti di contagio e diffusione.

Le tecniche molecolari (PCR, PFGE, DNAPROBE) potrebbero essere di aiuto per monitorare i ceppi resistenti essendo nota la natura eterogenea di tale resistenza che può rendere complicato o dubbio il test convenzionale di sensibilità eseguito.

G087**EZIOLOGIA DELLE INFEZIONI BATTERICHE URINARIE E RESISTENZA AI CHEMIOTERAPICI OTTO ANNI DI OSSERVAZIONE**

Grasso E., Grassi P., Mazzurco A. Trapanotto G., Lombardo A., Dimitriou A., Sciacca A.

Laboratorio Analisi Az. Policlinico Università Catania

Le infezioni delle v.u. sono caratterizzate da grande polimorfismo sia da un punto di vista clinico che etiologico. La scelta della terapia antibiotica deve essere effettuata considerando le condizioni fisio-patologiche del paziente, la sede dell'infezione, l'età, eventuale infezione ambulatoriale o ospedaliera. Abbiamo valutato le urine coltivate provenienti da vari reparti clinici (pediatria, chirurgia, neurologia, terapia intensiva), day-hospital e ambulatoriali esterni effettuate dal 1996 a oggi per evidenziare le eventuali resistenze agli antibiotici comunemente usati.

Sono state considerate positive n°1949 urine che presentavano una carica $\geq 10^5$ ufc/ml o cariche inferiori ma associate a sintomatologia significativa o germi particolarmente virulenti. Le urine sono state seminate nei terreni di coltura con ansa calibrata (10µl), le identificazioni e i relativi antibiogrammi sono state eseguiti con sistema automatico Vitek 1

bioMérieux.

Come atteso *E.coli* è il patogeno dominante (56,7 %) seguito da *Klebsiella* sp (14%), *Proteus* sp.(9,7%) , Enterococchi (8%), *Pseudomonas*.(6,3%), *Staf.*(1,6%)

Le % di resistenza riscontrate nei confronti dei chemioterapici maggiormente in uso sono le seguenti:

	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomon.</i>	<i>taf.aureo</i>	Enterococco
Ampicilina	42	91	54	/	/	28
Amox+ac cl	16	53	21	/	33	/
Cefotaxime	8	27	20	75	55	/
Ceftazidime	11	31	28	49	/	
Netilmicina	3	32	22	30	25	12
Co-trimoxaz.	20	14	40	93	25	
Ciprofloxac.	8,8	7	10	32	30	33
Fosfomicina	8	17	52	/	50	58
Nitrofurant.	4,6	15	88	90	0	4

I nostri dati concordano con quelli di altri AA. La resistenza ai vari antibiotici è stata evidenziata, anche se con percentuali differenti, sia nei campioni di provenienza ambulatoriale che ospedaliera.

Ampicillina e co-trimoxazolo, farmaci comunemente usati su base presuntiva per il trattamento delle i.v.u. non possono più considerarsi farmaci di prima scelta date le alte percentuali di resistenza evidenziate.

Fosfomicina e nitrofurantoina sono risultate tra le molecole più attive.

Dal nostro studio si evince che la sorveglianza delle sensibilità batteriche in una data popolazione è essenziale nel trattamento empirico di una cistite acuta non complicata. L'esame colturale con il relativo antibiogramma diventano indispensabili nei casi di recidive e nelle infezioni nosocomiali.

G088

PARASSITOSI DA *DIROFILARIA REPENS*: ESPERIENZA PERSONALE DI UN CASO IN ABRUZZO

Sisino L., Fabbri V.

Laboratorio di Microbiologia
Ospedale Civile "G.Mazzini",
Piazza Italia, 64100 Teramo

Introduzione La *Dirofilaria repens* è un nematode parassita dei canidi e dei felidi, diffuso nel mondo ed in Italia, soprattutto nel Settentrione. Gli adulti si localizzano nel sottocutaneo, producendo microfilarie sanguicole che passano da un animale all'altro per mezzo di ospiti intermedi quali varie specie di zanzare, tra cui quelle zooantropofile.

L'uomo rappresenta un ospite occasionale, nel quale l'adulto di *dirofilaria* produce noduli sottocutanei o polmonari, migrando anche sotto la congiuntiva.

Caso clinico Il nostro studio ha valutato il caso di un paziente di anni 62 che si è presentato all'osservazione anamnestica per una neoformazione pruriginosa del cuoio capelluto presente da almeno due anni, verosimilmente assimilata ad una cisti sebacea. A seguito di un intervento chirurgico di escissione del nodulo si è rilevata la presenza di un esemplare di nematode vivo, della lunghezza di circa 14 cm., ascrivibile al genere *Dirofilaria*. Successivamente il paziente è stato monitorato con esami chimico-clinici, radiografia al torace ed ecocardiogramma i cui risultati non hanno evidenziato particolari alterazioni. L'esemplare è stato inviato all'Istituto Superiore di Sanità per l'identificazione di specie

con le tecniche di biologia molecolare che hanno confermato il sospetto diagnostico in *Dirofilaria repens*. Per il paziente non è stato necessario un ulteriore intervento terapeutico oltre l'escissione chirurgica poiché l'uomo è considerato un ospite occasionale.

Conclusioni La peculiarità del caso dipende a nostro parere dalla bassa prevalenza di dirofilariosi umane diagnosticate in Abruzzo rispetto a regioni come il Piemonte e la Lombardia, dove si ha una prevalenza dell'80%, e dall'assenza totale di condizioni a rischio del paziente.

G089

TEN-YEARS ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PATTERNS FOR *ESCHERICHIA COLI* IN URINE CULTURES COLLECTED AT DESIO HOSPITAL

Solaro M.; Galbiati E.; Crespi C.; Limonta G.; Colombo L.; Mocarelli P.

Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio,
Ospedale di Desio, via Mazzini 1, 20033 Desio (MI)

Purpose The aim of the study was to document antimicrobial susceptibility patterns for *Escherichia coli*, the main pathogen in urinary tract infection (UTI), to help the selection of empirical treatment.

Methods We reviewed results of urines collected at Desio Hospital from 1993 to 2002 (inpatients and outpatients). Midstream (MSU) and catheter (CTU) urines were cultured using standard methods. Identifications and sensitivity tests were performed by Bactident *E.coli* (Merck) and Vitek (Biomérieux). Quality control included weekly sensitivity tests for *E.coli* ATCC25922 and participation in Bio-Development (1993-2002) and UKNEQUAS (2001-2002) schemes. *E.coli* antibiograms were retrieved from the laboratory database after duplicates exclusion; patterns of susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid (AMC), cefotaxime (CTX), nitrofurantoin (FD), norfloxacin (NOR) and trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) were studied by SAS software.

Results During the study period the laboratory received 13,934±1,277 (mean±SD) MSU and 973±98 CTU per year; the positive cultures were respectively 1,559±178 (11.2%) and 321±77 (33.0%). Among these 1,216±103 (78.0%) and 104±25 (32.4%) grew *E.coli*. CTX and FD maintained high sensitivity (CTX: over 99.5% in MSU, over 97.7% in CTU; FD: over 98.1% and over 93.8% respectively). AMC sensitivity was lower (87.2–87.9% in MSU, 76.0–78.0% in CTU). SXT showed a decreasing trend in MSU (from 90% to 76.8%) and a non-significant trend in CTU (from 76.1% to 64.8%). NOR sensitivity in MSU remained over 89.6% till 2000, but decreased to 86.2% subsequently; it ranged from 69.2% to 85.3% with no trend in CTU.

Conclusion In people of Desio area FD is a good alternative to fluoroquinolones in uncomplicated UTI. *E.coli* shows a recent but concerning decrease of sensitivity to NOR. Resistance to SXT exceeds 20%, causing problems when used as first-line antimicrobial. Fluoroquinolones and third-generation cephalosporins remain the first choice for catheterised patients UTI, where *E.coli* is implicated only in one third of cases.

Reference National Committee for Clinical Laboratory Standards: Approved Guideline M39-A. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data. NCCLS, 2002, Villanova, Pa.

G090**INDAGINE EPIDEMIOLOGICA 2000-2002 DEI PARASSITI FECALI NELL'AREA NOVARESE.**

Gigli C., Crobu M.G.S., Ferrante R., Cestagalli L., Fortina G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia Azienda Ospedaliera
"Maggiore della Carità", Novara.

Scopo

Scopo del nostro lavoro è stato quello di indagare la prevalenza delle varie specie parassitarie nella popolazione indagata; valutare le specie parassitarie trovate in relazione alla provenienza del paziente; fornire l'epidemiologia di due anni di osservazione.

Materiali e Metodi:

Durante il triennio 2000-2002 sono pervenuti presso il Laboratorio di Microbiologia di Novara 4.186 campioni fecali per ricerca parassitologica.

I campioni esaminati erano provenienti sia da pazienti ospedalizzati che da pazienti ambulatoriali residenti nel nostro territorio.

I campioni erano conservati in contenitori con formalina al 10%.

Il metodo utilizzato è stato quello della filtrazione e concentrazione per tutti i campioni. La colorazione con Zielh-Nelsen e Giemsa veniva riservata per i campioni macroscopicamente diarroici e/o provenienti da i seguenti reparti: Pediatria, Malattie Infettive e pazienti ospedalizzati di età superiore ai 65 anni. Il metodo Baerman è stato usato quando veniva segnalato un sospetto clinico per strongiloidiasi; lo scotch test per i casi di ossiuriasi.

Risultati:

In tale periodo sono state isolati i seguenti parassiti: *Taenia saginata* 26; *Taenia solium* 1; *Enterobius vermicularis* 17; *Ascaris lumbricoides* 2; *Blastocystis hominis* 25; *Entamoeba coli* 2; *Strongyloides stercoralis* 1; *Isospora belli* 1; *Hymenolepis nana* 3; *Giardia lamblia* 14.

I pazienti da cui è stata isolata la *T. saginata* sono 19 maschi e 7 femmine, range di età 15-82 con una media di 46; per gli ossiuri 6 maschi e 11 femmine l'età media è di 15 anni, range 4-36 anni. L'*H. nana* è stata isolata in tre bambini di età inferiore ai 10 anni; lo *S. stercoralis* in una donna di 60 anni. La *Giardia* è stata isolata in 8 maschi e 6 femmine, l'età media è 34 anni il range 2- 70 anni.

La *B. hominis* da 19 maschi e 6 femmine l'età media è 46 anni range da 15-82 anni.

L'*I. belli* è stata isolata da una paziente HIV+.

Conclusioni:

Tra la popolazione autoctona indagata la *T. saginata* è l'elminto isolato più frequentemente, seguito da *A. lumbricoides*, mentre *H. nana* è stato riscontrato in bambini provenienti da paesi stranieri e precisamente Albania e Brasile. Gli ossiuri hanno mostrato periodicità in coincidenza con l'inizio dell'anno scolastico interessando una popolazione quasi esclusivamente pediatrica, infatti in qualche caso si è assistito al coinvolgimento di altri membri famigliari.

Solo attuando, però, procedure specifiche di isolamento (colorazioni e metodo di Baerman) in base alla sintomatologia presente e all'anamnesi geografica si è potuto isolare un'*I. belli* da una paziente africana affetta da HIV non in trattamento chemioterapico, e larve di *S. stercoralis* in una paziente autoctona in condizioni immunodepresse.

Questi dati confermano ancora una volta quanto sia importante conoscere la provenienza dei pazienti e la loro sintomatologia per attuare le procedure tecniche più adeguate ad isolare le diverse specie parassitarie.