

MM Microbiologia Medica

n°2,2004

Indice analitico POSTERS

- LE INDICAZIONI A CARATTERE NORMALE INDICANO L'ARGOMENTO DEL POSTER.
- LE INDICAZIONI A CARATTERE *CORSIVO* SOTTOSTANTI A QUELLA DEL CARATTERE NORMALI PRECISANO GLI ARGOMENTI PRINCIPALI TRATTATI NEL POSTER
- IL NUMERO SI RIFERISCE AL CODICE DEL POSTER

Acinetobacter baumannii 087,088,075

Eco R1 087

ribotipizzazione 087

resistenza 088,075

terapia intensiva 088

beta lattamasi 075

geni bla 075

Adenovirus 193,195,196

nested PCR 193

campioni d'acqua 196

circolazione 196

Allergyflora 213

flora intestinale 213

Alternaria infectoria 125

cuore 125

trapianto 125

Amebe 140

diagnosi molecolare 140

meningoencefalite 140

Antibiotico, resistenza 097

Penne, Pesaro 097

Anti HIV, avidità 163

Arcanobacterium haemolyticum 059

vaginite 059

Ascaris lumbricoides 149

Astrovirus 195

Bacillus anthracis 069

VNTR 069

Batteri sentinella 089

Batteriemia 014,055,091,006

infezioni nosocomiali 014,006

pediatria 014

Roma 014

Palermo 055

trattamento standard 091

Borrelia burgdorferi 072,073

anamnesi 072

diagnosi precoce 072

gram negativi 010

resistenza 010

riacutizzazioni 010

Campylobacter spp. 016,015,048

antibiotico resistenza 016

biotipi 016

Campig-AMCLI 016

valutazione interregionale 015

genotipizzazione 048

Campylobacter jejuni 050

Guillam-Barré sindrome 050

Candida albicans 121

gene ERG II 121

ketoconazolo 121

pyrosequencing 121

Candida spp. 129

fluconazolo 129

Cateteri vascolari 004

infezioni da 004

Chirurgia, infezioni 043

sorveglianza 043

Chlamidia pneumoniae 085

asma bronchiale 085

Chlamidia trachomatis 076,020,053

amplificazione 076

geni plasmidici 076

urine 076

amplificazione LCR 020

DNA ribosomiale 020

Trieste 020

prostatite cronica 053

Chorus, sistema 217

Diesse 217

Chromagar Candida 003

sostanze tensioattive 003

Cladophialophora carrionii 119

cromoblastomicosi 119

Madagascar 119

terbinafina 119

Corynebacterium glucuronolyticum 024
liquido seminale 024
Citomegalovirus
 173,198,192,167,205,180,206,172,200,155
trapianto mieloblastico 173
allo-sct 173
intestino 198
trapianto 198,192
PCR real time 198,180,172
IgG avidity 192
Diesse 192
neonati 167
infezioni congenite 167
sordità neurosensoriale 167,155
trapianto renale 205,180
casistica Varese 206
antigenemia 172
trapianti 172
PCR quantitativa 200
plasma 200
Guthrie card 155
DBS test 155
CMV vedi citomegalovirus
Dientamoeba fragilis 142
EBV 156,157
trapianto 156
rene 156
linfomonociti 156
PCR quantitativa 157
Ehrlichiosi 012
caso clinico 012
zecca 012
Enterobatteri 100
ESBL 100
Enterococchi 017,042,094
riboprinter 017
pfge 017
VRE 017,042,094
circolazione endemica 094
pfge 094
Enterococcus faecium 081,034
resistente glicopeptidi 081
urine 081
GRE 034
siena 034
frequenza 034
Endoscopia digestiva 056
disinfezione 056
strumenti 056
contaminazione 056
Enterovirus 187
geni 187
suini 187
umani 187
Epatite B vedi HBc
Epstein Barr virus 201
casistica 201
Essudati 005

infezioni nosocomiali 005
Fibrosi cistica 062,051
patogeni 062
batteri non fermentanti 051
F-AFLP 047
infezioni nosocomiali 047
Funguria 122
Fusobacterium necrophorum 028
sindrome di Lemierre 028
Fusobacterium nucleatum 002
liquido pleurico 002
rapid ID32ANA 002
Glicocalice 067
antibioticoresistenza 067
dispositivi protesici 067
Graffio di gatto 227
epidemiologia 227
sierologia 227
Hbc 203
IgM anti 203
chemiluminescenza 203
HBsAg 207
antigene 207
viremia 207
HBV 182,190,188
infezione acuta 182
lamivudina 190,188
affigene HBV 190
snagtec molecular diagnostic 190
HCV 174,160,151,169,161
axsym kit 174
campione/cut off 174
genotipizzazione 160
genotype HCVIII nuclear 160
laser medicine 160
ribavirina 160
core 151
rna 169
NAT 169
chiron procleix 169
roche ampliscreen 169
incidente ospedaliero 161
Helicobacter pylori 065,008,011
sistema chorus 065
IgG 065
diesse 065
resistenza 008
cagAisland 011
antibiogramma 011
Herpes virus 1-2 177
anticorpi anti 177
Herpes virus simplex 2 (HSV) 166
follicolite 166
HIV/HCV donatori sangue 183
chiron TMA 183
riba 183
HIV anti, test 181
chemiluminescenza 181

- HIV-1 178**
sottotipi non B 178
gene pol 178
Campania 178
HPV vedi papillomavirus
Isotiosemicarbazoni 133
Candida spp. 133
HTLV I-II, anticorpi 204
genelabs diagnostici 204
Immulite 2000 208
toxoplasma 208
rubella 208
pazienti HIV 204
Influenza, vaccinazione 210
servizio di laboratorio 210
Ixodes ricinus 147
babesia 147
rickettsie 147
Lacrime, 058
schizomiceti 058
batteri diversi 058
Legge 626/94 215
Legionella pneumophila 013
new legionella kit analitica 013
Venezia 013
Leishmania infantum 138
laringe 138
Leishmania viscerale 143
nested PCR 143
Leptosirosi 060
real time PCR 060
Linezolid 033
enterococchi 033
pneumococchi 033
Linfoadenopatie 018
Madagascar 018
Liquor diagnostica 225
protocollo 225
Listeria monocytogenes 031, 029
Vidas LM 02 031
miocardite 029
Malaria 148
immunocromatografia 148
Miceti 130
identificazione rapida 130
Micoplasmi 083
prostatite cronica 083
test Mycofast evolution 083
Microbiologia clinica 223
organizzazione 223
Microbiologo clinico 219
evidence based technology 219
Microscopia elettronica 154
infezioni virali 154
Micobatterologia 116, 106, 107
sali tetrazolio XTT 116
isolamento 106
Novara 1994-2003 106
M avium complex 107
MRSA 030
rapid 030
pfge 030
Mycobacterium tuberculosis 118, 111, 112, 115
TB-MDR 111
BD Probetec 118
resistenza 112
Foggia 112
pyrosequencing 115
etambutolo 115
resistenza 115
Mycobacterium bovis 113
tubercolosi da 113
trasmissione familiare 113
Mycobacterium ulcerans
ulcera di Buruli 100
Micoplasmi urogenitali 086
aborti 086
Mucormicosi 127
vertigini 127
orecchio 127
Neonati, patologia 001
campioni clinici 001
studio retrospettivo 001
Nocardia asteroides 120
affezioni polmonari 120
Nocardiosi 132, 128
rene 132
trapianto 132
immunocompromessi 128
co-trimossazolo 128
Norovirus 194
enterite 194
Papillomavirus (HPV)
184, 164, 191, 214, 152, 159, 165, 170, 202, 185
amplimedical 184
Inno Lipa 184
Elisa 184
genotipizzazione 184, 202
HPV-DNA 164
nested PCR 164
brush lingua 164
DNA estrazione 191
inno-lipa 191
tipizzazione molecolare 214, 185
citologia cervicale 214
real time PCR 152
cancro cervice 159
HPV-DNA genotipo 16 165
epitelio linguale 165
fattori prognostici p16ink4a 170
Parassiti, concentrazione 141
para-pak spinder 141
Parassitologia 139
sierologia 139
alifax 139
toxocara 139

- Ancona 139**
Parassitosi intestinali 137,136
linee guida 137
Entamoeba histolytica 136
elmintosi 136
Parvovirus B19
real time PCR B19
Piante aromatiche 071
pseudomonas aeruginosa 071
Poliomavirus 175
nested PCR semiquant 175
Polmoniti ospedaliere 095
eziologia 095
Prodotti naturali 070
sensibilità E.coli 070
Propoli 041
Strept.agalactiae 041
Strept.pyogenes 041
Pseudomonas aeruginosa
061,049,074,038,054,052
metallo beta lattamasi IMP-13 061
carbapenemi 061
antibiotico resistenza 049
metallobetalattamasi 074
imipenem 074
glicopeptidi 038
ceftazidime 038
resistenza a Palermo 054
anticorpi 052
fibrosi cistica 052
Real Time PCR
leptospirosi 060
Resistenze batteriche 082
Ospedale Maggiore Milano 082
Respiratorio apparato,infezioni 101
sensibilità antibiotici 101
Castrovillari 101
Rhizopus oryzae 126
Rhodotorula 124
cornea 124
Rianimazione 026
Roma 026
resistenze 026
antibiotici 026
Rotavirus 158,195
infezioni ospedaliere 158
Sale operatorie 220
valutazione igienica ambientale 220
AT rest 220
operational 220
Salmonella 048
genotipizzazione 048
Salvia officinalis 228
igiene intima 228
Sangue,unità 218
nucleic acid testing(NAT)218
HIV/HCV ChironProcleix 218
monitoraggio 218
Sapone antisettico 212
attività 212
terapia intensiva 212
Sensibilità antibiotici 045
Cremona 1999-2003 045
commissione infezioni ospedaliere 045
meticillino resistenza 045
Schistosoma mansonii 131 045
Sporobolomyces salmonicolor 131
fungemia 131
immunocompromissione 131
ambisone 131
Sporothrix shenckii 134
sporotricosi cutanea 134
Itroconazolo 134
Stafilococchi meticillino resistenti 222
Stafilococchi oxacillino resistenti 046
naso 046
prevenzione infez ospedaliere 046
Staphylococcus aureus 103,040,104,027
tampone faringeo 103
oxacillino resistenza 040
pediatria 040
enterotossina 104
multiplex PCR 104
resistenza 027
Latina 027
Streptococchi beta emolitico 019
infezione neonatale 019
Streptococcus agalactiae 168
denka-seiken 168
Streptococcus pneumoniae 023,090
fenotipi di resistenza 023
vaccinati 023
pediatria 090
Streptococcus pyogenes 032,092,036,044
resistenza 032,036
tampone faringeo 032,036
rabdomiolisi 092
meningite 092
resistenze 044
tamponi faringei 044
Strongilioidiasi 231
Strongyloides stercoralis 230, 145,144
casi clinici 145
pazienti anziani 144
anticorpi 144
Tetano 077,078
incidenza 077
vaccinazione 078
tossina 078
Thymus vulgaris 228
igiene intima 228
Tricocefalosi 135
trichuris trichiura 135
Toxoplasmosi 146
nested PCR 146
gene B1 146

- real time PCR* 146
Toxoplasma gondii 068,216
sistema Chorus 068
Diesse 068
elisa 068
IgM 216
Tubercolosi 109,105
fuor 109
Abruzzo 105
osservazione 105
(vedi anche *Mycobacterium tuberculosis* e correlate)
Tubercolosi extrapolmonare 117
PCR 117
Ureaplasma ureolyticum 063
neonati 063
Urinarie,infezioni 079,084
pediatria 079
di comunità 084
costi-benefici 084
Urinocolture 102,022,007
laboratorio privato 102
enterococcus faecalis VM-R 102
indicatori di qualità 022
miglioramento servizio 022
infezioni ospedaliere 007
- UROQUICK** 037
sensibilità 037
terapia intensiva 037
Vaccinazione 171
antiepatite B 171
Vagina, flora batterica 035
gravidanza 035
Vaginiti 229,098
Penne (PE) 098
Vie aeree,infezioni 099,064
ventilazione artificiale 099
protocollo profilassi 099
infezioni ospedaliere e comunitarie 064
Vie lacrimali 058
schizomiceti 058
batteri diversi 058
Virus respiratori 176
shell vial 176
metodo rapido 176
DFA 176
Virus Toscana 197
meningiti estive 197
Yersinia 021,048
PFGE 021
RAPD-PCR 021
genotipizzazione 048

poster

9-10-11 Giugno 2004
*Batteriologia, Micobatteriologia, Micologia,
Parassitologia, Virologia, Varie*

P001

MONITORAGGIO DI MICRORGANISMI ISOLATI DA CAMPIONI CLINICI DI UN REPARTO DI PATOLOGIA NEONATALE.

Allù M.T., Finocchiario C.

Laboratorio di analisi chimico-cliniche e microbiologia,
Ospedale M.P. Arezzo Ragusa.

Introduzione Il neonato presenta un rischio d'infezione elevato in ragione dell'immaturità del suo sistema immunitario e di diversi organi, come pelle, polmoni o tratto intestinale. Poiché nel periodo intrauterino non è normalmente colonizzato da microrganismi, al momento della nascita il neonato viene improvvisamente a contatto con la flora microbica della madre, così come quella dell'ambiente ospedaliero. I neonati ammessi nei reparti di cure intensive sono ad alto rischio di infezioni nosocomiali, soprattutto quando il loro peso alla nascita è inferiore ai 600gr. Altri fattori di rischio sono: ventilazione meccanica, catetere venoso centrale e catetere ombelicale venoso o arterioso. Attraverso uno studio retrospettivo di un biennio 2002-2003 sono stati analizzati i dati ottenuti dall'esame colturale di campioni clinici di neonati con segni di sepsi e prematuri, al fine di valutare le variazioni dei microrganismi e loro relativa antibiotico-resistenza. **Risultati** Sono stati analizzati 1420 campioni e risultati positivi 220 (15%). Tra i microrganismi isolati le specie di Gram-negativi predominanti sono risultati: 35 *E.coli* (16%), 27 *Klebsiella pneumoniae* (13%), 33 *Pseudomonas aeruginosa* (15%) 8 *Enterobacter cloacae* (4%).

Tra i Gram-positivi le specie predominanti sono risultate: 35 *S.aureo* (16%), 20 *S.epidermidis* (9%), 13 *S.Co.N.* (6%), 8 *Enterococchi spp* (4%) e 7 SGB (3%). Tra i lieviti la specie predominante è risultata *C.albicans* (7%) e *C.glabrata* (3%). La sensibilità dei Gram-negativi agli antibiotici è risultata del 100% per amikacina, gentamicina, netilmicina ed imipenem, a cefotaxime: (81% in *E.coli*, 98% in *Klebsiella*) a cef-tazidima: (88% in *E.coli* e 98% in *Klebsiella*).

Tra i Gram-positivi sono risultati sensibili a vancomicina e teicoplanina: (100% *Stafilococchi*, *Enterococchi*), tra gli *Stafilococchi aurei* i ceppi oxacillina resistenti sono risultati il 14%, tra gli *stafilococchi epidermidis* e *S.Co.N.* sono risultati oxacillina-resistenti il 98%.

Conclusioni L'analisi dei dati nel biennio consente le seguenti osservazioni: aumento dei Gram-positivi dovuto ad un incremento dell'isolamento di *Stafilococchi Co.N.*, SGB, ed *Enterococchi*; Diminuzione degli isolamenti di *E.coli*, *Pseudomonas* ed *Enterobacter*, mentre le specie di *Klebsiella* sono aumentate. Aumento delle resistenze ai seguenti antibiotici: amox., pip., cefalotina e ticarcillina per *E.coli*. Si ringrazia per la collaborazione data il Sig. Stornello Carmelo (Tecnico di laboratorio).

P002

EMPIEMA PLEURICO DA *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*: CASO CLINICO

Allù M.T., Finocchiario C.

Laboratorio analisi chimico-cliniche e microbiologia
Ospedale M.P. Arezzo Ragusa.

Introduzione *Fusobacterium nucleatum* è un bacillo gram-negativo anaerobio ed asporigeno, ha una forma affusolata

sottile e filamentosa. F.n. fa parte della flora normale orofaringea, genitale e gastrointestinale ed è coinvolto con maggiore frequenza nelle infezioni pleuropolmonari da anaerobi. **Materiali e metodi** Paziente di 76 anni diabetico viene ricoverato in Chirurgia toracica per Broncopneumopatia, il paziente riferisce di avere accusato da qualche mese tosse, febbre e calo ponderale. Viene eseguita la Tac del torace che conferma la diagnosi di empiema pleurico saccato; gli esami ematochimici evidenziano una leucocitosi neutrofila (G.B. = 19.200/mmc di cui 92% neutrofili, Fibrinogeno: 1043mg/dl e PCR: 324mg/l). Viene eseguita la toracentesi ed il liquido pleurico di aspetto purulento viene inviato in laboratorio per l'esame batteriologico. Dall'esame batterioscopico diretto si evidenziano numerosi granulociti neutrofili e bacilli gram-negativi. L'esame colturale viene eseguito utilizzando i seguenti terreni di coltura: agar sangue, agar mac-conkay, ed agar cioccolato ed incubati a 37° in aerobiosi, agar schaedler e agar schaedler con kanamicina e vancomicina e incubati a 37° in anaerobiosi.

Dopo 48 ore di incubazione si osserva crescita solo sulla piastra di agar-schaedler, le colonie si presentano di colore bianco e di aspetto granuloso ed opalescenti. Dalla coltura si esegue la colorazione di Gram e si osservano dei bacilli Gram-negativi di forma affusolata. Il test della catalasi risulta negativo. Si procede all'identificazione biochimica utilizzando la galleria RapidID32ANA, incubata in aerobiosi a 37° per 4 ore. Si esegue l'antibiogramma utilizzando la galleria ATB-ANA che consente di saggiare la sensibilità agli antibiotici in terreno semisolido in condizioni simili a quelle delle tecniche di riferimento di agar-diluizione. Il paziente viene sottoposto a pleurotomia e drenaggio del cavo pleurico e trattato con amox.ac.clav. lcp33/die.

Risultati Il ceppo è risultato sensibile a amox.-ac.clav., piperacillina, cefotetan, pip.+tazobactam, penic., imipenem, ticarc., clindamicina, cefoxitina.

Conclusioni In caso di ascessi saccati l'immediato intervento chirurgico è di estrema importanza poiché la terapia antibiotica è generalmente inefficace fintanto che l'essudato non viene drenato.

P003

UTILIZZO DI CHROMAGAR CANDIDA NELL'ISOLAMENTO DI LIEVITI: INFLUENZA DI SOSTANZE TENSIOATTIVE (TWEEN 80) NELL'IDENTIFICAZIONE PRELIMINARE

Fanello M.R., Andreoni S., Molinari G.L., Kroumova V., Fortina G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia,
Ospedale Maggiore Novara

In microbiologia clinica, l'identificazione preliminare di microrganismi, isolati da materiali di provenienza umana, si basa generalmente su caratteri morfologico-tintoriali acquisiti su substrati colturali di crescita, non disgiunti da proprietà metaboliche determinate direttamente o indirettamente dai medesimi substrati.

A tale scopo, da alcuni anni, hanno trovato uno spazio sempre più rilevante substrati cromogenici e policromogenici, contenenti miscele di sostanze dalla cui idrolisi deriverebbero colonie a diversa tingibilità, in relazione al tipo di microrganismo isolato (genere-specie).

Chrom Agar Candida è un terreno cromogenico utilizzato per l'identificazione presuntiva di lieviti. In nostre precedenti esperienze, si confermò la capacità discriminante di Chrom Agar Candida, con la possibilità di un'identificazione pre-

suntiva per le specie fungine di più frequente isolamento clinico. Dalle nostre osservazioni risultò come le proprietà morfologico-tintoriali risultassero maggiormente apprezzabili nel tempo, rimanendo difficoltosa la distinzione di alcune specie poco dissimili. In tema di morfotipizzazione, in un'altra esperienza personale, venne osservato come sostanze tensioattive potessero influenzare caratteri morfo-strutturali e tintoriali (Tween80) di lieviti.

Scopo dell'indagine fu quello di verificare l'influenza di Tween80 sugli aspetti morfologico-tintoriali di Chrom Agar Candida, nell'identificazione presuntiva di lieviti.

P004

INFEZIONI CATETERE VASCOLARE-CORRELATE. EPIDEMIOLOGIA DEGLI ANNI 2001-2003 (OSPEDALE MAGGIORE NOVARA)

Kroumova V., Andreoni S., Crespi I., Molinari G.L., Moggi G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia,
Ospedale Maggiore Novara

L'importanza delle infezioni nosocomiali è riconosciuta da tempo. Una delle infezioni ospedaliere più frequenti e più importanti è quella correlata ai cateteri venosi centrali.

Dati recenti indicano che negli Stati Uniti si verificano circa 200.000 casi di setticemie cateteri correlati ogni anno con una mortalità variabile tra il 12 e il 25%.

I dati presentati riguardano un'indagine condotta negli anni 2001-2003, che ha coinvolto 2079 colture di cateteri vascolari. L'analisi rileva una netta prevalenza di microrganismi Gram positivi, in particolare di *Staphylococcus epidermidis* che, inoltre, mostra un incremento significativo nei tre anni raggiungendo nel 2003 la percentuale del 56,9%.

I Gram negativi, al contrario mostrano una tendenza alla diminuzione attestandosi nell'ultimo anno poco sopra il 13%. Altro dato interessante è la presenza, con una percentuale importante, di infezioni sostenute da miceti ed in particolare da *Candida albicans* con percentuali di poco inferiori al 10%. I dati relativi all'antibiotico resistenza sono limitati a *Staphylococcus epidermidis*, in quanto unico microrganismo con un numero di isolamenti tale da consentire un'analisi statistica significativa.

Le percentuali di resistenza presenti risultano sufficientemente costanti nei tre anni tranne che per il gruppo dei fluorochinoloni dove si evidenzia un importante incremento tra il 2001 e il 2002 con percentuali di resistenza che vengono confermate anche nell'anno 2003.

Lo studio è concluso da un'osservazione che tende ad evidenziare, in campioni appartenenti allo stesso paziente, le contemporanee positività nelle colture da catetere e da emocoltura.

Da queste emerge l'elevata positività nelle colture da catetere e da sangue quando il microrganismo isolato è *Candida albicans*. Al contrario molto basse risultano le contemporanee positività per *Staphylococcus epidermidis* e per *Pseudomonas aeruginosa*.

P005

INFEZIONI NOSOCOMIALI: MICROBIOLOGIA DI ESSUDATI LIQUIDI E SOLIDI DEGLI ANNI 1995-1997 E 2000-2002 (OSPEDALE MAGGIORE DI NOVARA)

Andreoni S., Molinari G.L., Kroumova V., Crespi I., Schiralli E.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia,
Ospedale Maggiore Novara

La microbiologia di essudati liquidi e solidi provenienti da Unità operative ospedaliere ripropone il problema se il materiale in esame possa corrispondere ad un processo infettivo da ascrivere ad un'origine nosocomiale, oppure ad una extraospedaliere. Il postulato che una infezione sia da considerarsi ospedaliere se si manifesta 48-72 ore dopo il ricovero, offre certamente lo spunto per una possibile discriminazione quando questa sia suffragata da validi criteri clinici. Per il laboratorio, la microbiologia degli essudati spesso non può basarsi sul tipo di materiale inviato e riproporsi in una dinamica più epidemiologica che clinica. Di recente, è stato fatto osservare che in queste due ultime decadi è aumentato numero e gravità di infezioni da batteri gram-positivi: sono stati chiamati in causa *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA), resistenti a glicopeptidi (GISA), nonché stafilococchi coagulasi-negativi, progressivamente resistenti ai beta-lattamici e ad altri raggruppamenti di molecole. Lo stesso vale per enterococchi, soprattutto *E. faecium* vancomicina-resistente (VRE). Le nostre osservazioni in tema di microbiologia di essudati di riscontro ospedaliero hanno perseguito due obiettivi principali: i) definire a livello di genere e specie, o comunque tassonomico, le popolazioni batteriche, coinvolte o semplicemente presenti nel materiale in esame; ii) verificare se nel corso di più annate, con l'avvento di nuove tecniche e di nuovi approcci terapeutici, l'epidemiologia di tali popolazioni sia andata incontro per tipo di presenza e grado di distribuzione a significative modificazioni. Le nostre osservazioni, praticate su 10.878 campioni di essudato, esaminati nel corso delle annate 1995-1997 e 2000-2002, hanno confermato la notevole varietà di agenti batterici e fungini che possono essere repertati in tale materiale. Come in numerose altre indagini al riguardo, sono emersi in primo piano batteri del genere *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*), enterobatteri, tra cui *Escherichia coli* e, tra i non fermentanti, *Pseudomonas aeruginosa*. Notevole la presenza di streptococchi, in particolare di *S. agalactiae* e di *S. pyogenes*, nonché di enterococchi (*E. faecalis*, *E. faecium*). Infine, i nostri accertamenti non hanno deposto per una "conversione" di specie incriminate stante la notevole sovrapposizione dei reperti rispettivamente delle annate 1995-1997 e 2000-2002.

P006

INFEZIONI OSPEDALIERE: MICROBIOLOGIA DELLE BATTERIEMIE DEGLI ANNI 1995-1997 E 2001-2003 (OSPEDALE MAGGIORE NOVARA)

Crespi I., Kroumova V., Molinari G.L., Andreoni S., Brunelli G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia,
Ospedale Maggiore Novara

Le infezioni nosocomiali rappresentano una delle maggiori e più comuni complicanze dei ricoveri ospedalieri con impor-

tanti implicazioni sociali anche di carattere economico. All'interno di queste sicuro rilievo rivestono quelle sostenute da microrganismi presenti nel torrente ematico. Un tale riscontro è riconosciuto universalmente come dato di certa e grave infezione.

Per questo motivo abbiamo voluto considerare le positività all'indagine emocolturale nei campioni eseguiti presso il nostro Laboratorio negli anni 1995-1997 e 2001-2003, cercando di valutare in questo modo anche le eventuali differenze fra i due periodi.

Nell'indagine sono state valutate le diverse positività riscontrate nei vari anni, sia in relazione ai microrganismi isolati, sia ai Reparti di provenienza. Relativamente allo *Staphylococcus aureus* è significativa la diminuzione che si verifica nel 1997 rispetto ai due anni precedenti. Questo dato viene confermato anche nel secondo periodo.

Lo *Staphylococcus epidermidis* si conferma il microrganismo di più frequente isolamento con percentuali costanti in tutti gli anni. Relativamente ai Gram negativi la loro percentuale rimane sufficientemente stabile nei due periodi. Per quanto si riferisce ai miceti si nota una significativa diminuzione tra il primo e secondo periodo. La valutazione degli isolamenti negli anni 2001-2003, differenziata per gruppi di Reparto, non evidenzia particolari dati se non una certa aumentata presenza di enterobatteri nel gruppo "terapie intensive" rispetto agli altri gruppi oltre ad una conferma della predominanza di isolamenti di Gram-positivi ed in particolare di microrganismi del genere *Staphylococcus* nei tre raggruppamenti considerati.

P007

INFEZIONI OSPEDALIERE: MICROBIOLOGIA DI URINOCOLTURE DEGLI ANNI 2000-2002 (OSPEDALE MAGGIORE DI NOVARA)

Molinari G.L., Crespi I., Andreoni S., Kroumova V., Peroni P.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia,
Ospedale Maggiore Novara

Da recenti dati di letteratura è stato ulteriormente confermato che, a livello ospedaliero, le infezioni del tratto urinario (UTI) sono le più comuni, rappresentando infatti il 23-49% di tutte le infezioni nosocomiali; è ugualmente interessante sottolineare che il 62,8% di queste ultime infezioni siano correlabili all'impiego di catetere vescicale.

Nell'ambito dei microrganismi responsabili di UTI, la maggior positività risulta correlata ai Gram negativi (con netta prevalenza di *E.coli*), seguita poi da una percentuale più bassa di Gram positivi (soprattutto il genere *Enterococcus*) ed infine dai miceti.

In base ai nostri risultati, che hanno riguardato 3.236 campioni nosocomiali positivi di urina, è stato rilevato che il 31,3% delle suddette positività fossero da attribuire ai Reparti Chirurgici, il 59,3% ai Reparti Medici, mentre percentuali decisamente più basse (4,1% e 5,2%) da attribuirsi rispettivamente alla Terapia Intensiva e al Centro Trapianti Renali. Si può altresì evidenziare che esiste una netta differenza qualitativa e quantitativa tra i microrganismi ottenuti da urina proveniente da "catetere" rispetto alle urine provenienti da "mitto intermedio". In merito alla distribuzione delle specie batteriche in funzione della modalità di raccolta, una notevole differenza quantitativa è stata stabilita a livello di *E.coli*, nel senso di una percentuale assai elevata, pari a più della metà dei campioni positivi ottenuti da "mitto intermedio", rispetto ai campioni etichettati come "catetere".

A livello di microrganismi ottenuti da urine da "catetere" è stata inoltre evidenziata una notevole frequenza di isolamento di specie appartenenti a generi di raro riscontro (*Achromobacter*, *Burkholderia*, *Pichia*, *Saccharomyces*) ritrovati in particolare nel Centro di Trapianti Renali.

P008

HELICOBACTER PYLORI IN PAZIENTI PEDIATRICI: L'ESAME CULTURALE NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE E STUDIO DELLE RESISTENZE VERSO AMOXICILLINA, METRONIDAZOLO E CLARITROMICINA

Argentieri M.¹, Sabbi T.², Torroni F.², Dall'Oglio L.²,
Chiavelli S.¹, Menichella D.¹

¹Laboratorio di Microbiologia,

²Unità Operativa di Chirurgia e Endoscopia Digestiva, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù" Roma

Introduzione. *Helicobacter pylori* (Hp) causa una delle infezioni più diffuse nel mondo che interessa oltre il 50% della popolazione umana ed è acquisita soprattutto durante l'infanzia. L'infezione è riconosciuta come causa di gastrite cronica e malattia ulcerosa e come fattore di rischio per le neoplasie dello stomaco. La diagnosi si effettua con tecniche invasive che necessitano di un campione di biopsia gastrica (esame istologico, test rapido dell'ureasi, esame colturale) e con tecniche non invasive (sierologia, urea breath test, antigene nelle feci). La terapia eradicante si basa sull'associazione di un inibitore della pompa protonica e di due antibiotici (nitroimidazolici, macrolidi e beta-lattamici). La resistenza del batterio agli antibiotici solitamente usati in terapia rappresenta uno dei fattori più rilevanti nel fallimento terapeutico.

Scopo. Determinare l'accuratezza dell'esame colturale nella diagnosi di infezione da Hp in pediatria e valutare la frequenza delle resistenze verso amoxicillina, metronidazolo e claritromicina negli isolati di Hp in ambito pediatrico.

Materiali e metodi. 80 biopsie gastriche prelevate da altrettanti pazienti pediatrici (50 maschi; età 3-18 anni; età media 9 anni) sono state sottoposte a: esame istologico, colturale e test rapido dell'ureasi. 80 campioni fecali, provenienti dagli stessi pazienti, sono stati esaminati per la ricerca dell'antigene di Hp. Tutti i ceppi isolati in coltura sono stati testati per la sensibilità a amoxicillina, metronidazolo e claritromicina con il metodo E-test.

Risultati. I risultati (%) dei metodi diagnostici applicati sono riportati in tabella.

Test	SE (%)	SP (%)	VPP (%)	VPN (%)
Es. istologico	100	100	100	100
Es. colturale	92	100	100	96,5
Test dell'ureasi	72	96,3	90	88,3
Antigene fecale	56	87,3	66,7	81,3

SE, SP, VPP, VPN = sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo

Il test di sensibilità *in-vitro* ha evidenziato il 26% di isolati resistenti alla claritromicina e il 30% resistenti al metronidazolo; non sono state osservate resistenze all'amoxicillina.

Conclusioni. L'esame colturale di Hp, dimostrandosi una tecnica altamente specifica e dotata di buona sensibilità, è applicabile nella diagnosi di infezione nei bambini. Le resistenze del batterio ai farmaci usati nella sua eradicazione mostrano di avere una significativa diffusione anche in ambi-

to pediatrico; la coltura perciò è un passo fondamentale per monitorarne la diffusione e per ottimizzare il regime terapeutico prevenendo fallimenti nel trattamento dell'infezione.

P009

EMOCOLTURE E CONTAMINAZIONE DA CoNS: EFFETTI DELL'APPLICAZIONE DI UN SEMPLICE ALGORITMO DI LABORATORIO

Ballardini M.¹, Meledandri M.¹, Spagnesi L.¹, Pisanelli C.², Cattivelli M.¹, Maiorano S.¹, Chilesse F.¹, Evangelisti M.E.¹.

¹UOC Microbiologia e Virologia; ²UOC Farmacia
ACO S.Filippo Neri, Via Martinotti 20, 00135 ROMA.

Background. La contaminazione di emocolture da CoNS, in particolare *S.epidermidis*, rappresenta un inconveniente della fase di prelievo. La segnalazione dei probabili contaminanti cutanei (falsi positivi) potrebbe ridurre l'uso improprio degli antibiotici glicopeptidi.

Obiettivi. Quantificare la riduzione del numero di positivi dopo applicazione di un algoritmo lavorativo per individuare come contaminanti certi isolati di CoNS da emocoltura; valutare la riduzione del consumo di glicopeptidi.

Metodi. Le emocolture sono state lavorate mediante Bactec 9240. L'algoritmo, applicato da giugno 2002, prevede che 1) le singole emocolture positive per CoNS siano refertate come Contaminate;

2) che le emocolture positive da VP e CVC per CoNS (Δt crescita +120') siano lavorate solo se prelevate contemporaneamente; in caso contrario, sono identificate come Contaminate;

3) che i CoNS positivi, da isolati multipli, siano validati solo se l'identificazione e antibiotipo sono uguali o l'antibiotipo è diverso per non più di due antibiotici; tale procedura si applica anche per gli isolati di CoNS da multiple emocolture VP positive. Il programma epidemiologico (Italab c/s) calcola come negative le colture in cui i CoNS sono associati alla sigla Contaminante. La valutazione dei campioni ha riguardato il periodo 2001-2003. I consumi dei glicopeptidi (teicoplanina e vancomicina) sono stati espressi in DDD.

Risultati. Le emocolture positive, sul totale, sono diminuite da 26% (2001) a 19% (2002; 2003). La quota di emocolture contaminate, sulle positive, è passata da 0 (2001) a 15% (2002), fino a 19% (2003). Gli isolamenti da *S.epidermidis* da emocolture sono significativamente diminuiti (-44%) dal 2° semestre 2002. L'analisi temporale 2001-2003 degli isolati MRSE e del consumo di glicopeptidi mostra una tendenza alla progressiva riduzione. Si è osservata una significativa correlazione tra i due fenomeni ($R^2=0.826$; $P=0.016$).

Conclusioni. L'applicazione di un semplice algoritmo di lavoro sembra aver contribuito alla diminuzione degli isolamenti significativi di CoNS, in particolare di MRSE, con una parallela diminuzione del consumo dei glicopeptidi.

P010

ANTIBIOTICORESISTENZA RILEVATA NEI PATOGENI GRAM NEGATIVI ISOLATI NELLE RIACUTIZZAZIONI DELLE BPCO.

Barbaro P., Rogolino B.

U. O. di Patologia Clinica - Ospedale "E. Morelli" - Reggio Calabria

Introduzione – L'uso intensivo degli antibiotici in ambiente

nosocomiale, associato al prevalere nelle broncopneumopatie croniche ostruttive (BPCO) di pazienti afferenti per la maggior parte ad una popolazione anziana, ha determinato nel tempo, non solo una variazione della flora batterica verosimilmente responsabile delle riacutizzazioni, ma anche l'insorgere di resistenze nei confronti degli antibiotici più comunemente utilizzati. Questo lavoro, vuole porsi come contributo allo studio della eziologia e delle resistenze ai farmaci antimicrobici in particolare dei batteri Gram negativi Enterobatteri, e Gram negativi non fermentanti (GNNF), isolati nelle riacutizzazioni delle BPCO.

Antibiotici	Gruppo KES (126) % S	Enterobatteri (43) % S	<i>Ps aeruginosa</i> (79) % S	GNNF (35) % S
Cefixime	83	93	/	/
Cefotaxime	90	95	/	/
Cefuroxime	73	95	/	/
Ceftazidime	90	98	77	83
Cefepime	92	98	84	66
Ticarcillina	37	81	81	54
Piperacillina	83	93	89	77
Piper-tazobactam	98	100	90	77
Aztreonam	90	98	77	29
Ciprofloxacina	93	100	75	63
Levofloxacina	97	100	/	100
Imipenem	100	98	72	54
Meropenem	100	98	81	60
Gentamicina	96	98	75	71
Amikacina	98	100	92	77
Tobramicina	92	100	78	66

Materiali e metodi - Nel periodo di osservazione, compreso tra Aprile 2002 e Marzo 2003, sono stati presi in considerazione 870 campioni di espettorato, rappresentanti il primo campione raccolto subito dopo il ricovero, da pazienti affetti da malattia broncostruttiva in fase di riacutizzazione, secondo i criteri di Anthonisen, e ritenuti rappresentativi del focolaio d'infezione secondo i criteri di Bartlett. L'isolamento dei microrganismi è stato eseguito secondo le metodiche e i criteri microbiologici standard. Per l'identificazione delle specie Gram negative sono state utilizzate le gallerie ATB 32E ed ATB 32GN del sistema API (Bio-Merieux). La sensibilità agli antibiotici è stata saggiata mediante la determinazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC), in accordo con le indicazioni del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS), utilizzando il pannello in microdiluzione per Gram negativi SENSITITRE della TREK Diagnostic (Biomedical Service). Età media dei pazienti 75 ± 10 anni.

Risultati e Conclusioni – Degli 870 campioni di espettorato processati, 501 (57.6%), hanno portato all'isolamento di 738 microrganismi potenzialmente responsabili dei fenomeni di riacutizzazione, e 368 (42.4%), all'isolamento di flora comune orofaringea. Dei 738 batteri isolati, 196 (26.5%) sono risultati Gram positivi, e 542 (73.5%) Gram negativi di cui, 259 (35.1%) *Haemophilus spp* e *Moraxella*; 169 (22.9%) Enterobatteri e 114 (15.5%) *Pseudomonas* ed altri GNNF. La valutazione della antibiotico sensibilità è stata rivolta a molecole appartenenti alle classi di antibiotici usualmente utilizzati nella terapia della patologia respiratoria, cefalosporine, carbapenemici, monobattamici, ureidopenicilline, chinoloni, aminoglicosidi. Le molecole saggiate e le percentuali di sensibilità, sono riportate in tabella.

Complessivamente questi farmaci, si sono dimostrati molto attivi sia nei confronti degli Enterobatteri che dei GNNF, ad eccezione della Ticarcillina (37% di S) vs il gruppo KES, e dell'Aztreonam (29% di S) vs i GNNF non *P. aeruginosa*. L'osservazione che gli stessi farmaci dimostrano invece

un'attività abbastanza efficace vs gli altri Enterobatteri, (vedi Ticarcillina 81% di S), e vs *P. aeruginosa*, (vedi Aztreonam 77% di S), porta alla considerazione che la valutazione degli antibiogrammi eseguiti in una ben definita area geografica, consente non solo di avere un quadro delle resistenze batteriche per quell'ambiente ma, la conoscenza di questi dati epidemiologici potrebbe rappresentare una guida locale per una condotta terapeutica razionale nelle riacutizzazioni delle BPCO, evitando ove possibile, trattamenti empirici che potrebbero aggravare il problema dell'antibiotico resistenza, favorendo la selezione di ceppi batterici multiresistenti. A questo proposito diventa fondamentale, l'identificazione dell'agente eziologico responsabile della riacutizzazione.

P011

SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI E CORRELAZIONI CON IL GENOTIPO DELLA *cagA* ISLAND IN ISOLATI CLINICI DI *H. PYLORI*

Basaglia G., Giordari F., Sperandio P., Tomasini M.L., Zanussi S., Stocco Calzavara S., Pancino A., De Paoli P.

Struttura Complessa di Microbiologia, Immunologia e Virologia - Centro di Riferimento Oncologico, Istituto Nazionale Tumori - IRCCS, Via Pedemontana Occidentale, 12, 33081 Aviano (Pordenone).

Scopi/Obiettivi: L'infezione da *Helicobacter pylori* è associata a gastrite cronica, ulcera duodenale e gastrica, adenocarcinoma e MALT linfoma gastrici. Nell'evoluzione dell'infezione svolge un ruolo importante la regione genomica "*cag* Island", che presenta eterogeneità genica. Nel controllo delle patologie associate riveste grande importanza la sensibilità agli antibiotici. Scopo del presente studio è di valutare l'antibiogramma effettuato su insiemi di colonie ("cocktail") e colonie singole e in sedi gastriche diverse nello stesso paziente, di elaborare una epidemiologia locale delle resistenze e di confrontare il profilo genico con il profilo di resistenza.

Metodologia: Sono stati studiati i ceppi isolati da 50 pazienti (con prelievo singolo o da antro e corpo gastrico). L'antibiogramma è stato eseguito con E-test (su "cocktail" e colonie singole) per metronidazolo, claritromicina e amoxicillina. Da alcuni ceppi era noto il genotipo (PCR per i geni della *cag* Island: *cagA*, *cagE* e *virB11*).

Risultati: 1- Generalmente colonie singole della stessa sede sono omogenee per sensibilità e resistenza. In questi casi vi è sempre coincidenza con il risultato ottenuto sul "cocktail" della stessa sede. Quando le colonie singole risultano invece eterogenee, il risultato ottenuto sul "cocktail" è sempre resistente; 2- Generalmente nello stesso paziente vi è coincidenza di risultati nelle colonie isolate dall'antro e dal corpo. In alcuni casi con riferimento alla stessa molecola le colonie risultano sensibili all'antro e resistenti al corpo o viceversa; 3- La percentuale delle resistenze per paziente è risultata: metronidazolo 18%, claritromicina 42% e amoxicillina 0%; 4- Si è trovata un'associazione statisticamente significativa ($p < 0.02$) tra la presenza di *cag*-PAI intatta (presenza di *cagA*, *cagE* e *virB11*) e resistenza al metronidazolo.

Considerazioni conclusive: 1- Eseguire l'antibiogramma sul "cocktail" è un metodo buono e affidabile (le colonie singole possono essere eterogenee, ma le resistenze vengono sempre e tutte rivelate); 2- Data l'elevata corrispondenza tra risultati dall'antro e dal corpo, l'antibiogramma eseguito su un'unica sede rivela un'elevata attendibilità. L'esecuzione su due sedi aumenta ulteriormente la sensibilità; 3- La nostra casistica rileva per metronidazolo e claritromicina resistenze, non rilevate invece per amoxicillina; 4- L'associazione tra

la presenza di *cag*-PAI intatta e resistenza al metronidazolo sarà oggetto di ulteriori studi.

P012

EHRlichiosi:

DESCRIZIONE DI UN CASO CLINICO

Beltrame A.¹, Ruscio M.², Rorato G.¹, De Cecco L.¹, Bragantini F.¹, Cristini F.¹, Viale P.¹

¹Clinica di Malattie Infettive Policlinico Universitario a Gestione Diretta, Università degli Studi di Udine, Via Colugna n° 50, 33100 Udine

²Laboratorio Ricerche Cliniche e Microbiologia, Ospedale S. Daniele del Friuli, Via Trento e Trieste n°33, 33038 S. Daniele del Friuli

L'Ehrlichiosi granulocitica (HGE) è una zoonosi trasmessa all'uomo dalle zecche, riportata in alcuni paesi europei.

Il 23/07/03 un uomo (35 anni) è giunto alla nostra osservazione lamentando astenia e dolori muscolari al rientro da un viaggio in Ungheria per caccia (25/04/03 - 01/05/03). Il 28/04/03 il paziente riferiva morso di zecca e comparsa dopo 10 giorni di febbre (40°C), cefalea e rachialgia per alcuni giorni nonostante terapia antipiretica, con emergenza per 2 giorni di paresi dell'arto superiore dx. Successivamente sono comparsi astenia severa, calo ponderale, artro-mialgie (arti inferiori). Gli esami (9/05/03) evidenziavano: GB 9570/mmc (63.3% N, 25.2% L, 7.5% M), VES 5 mm/h, PCR 0.34 mg/dl, creatinina 1.18 mg/dl, AST 171 U/L, ALT 205 U/L, γ GT 202 U/L, ALP 54 U/L, bilirubina 0.61 mg/dl. Le sierologie per EBV, CMV, toxoplasmosi indicavano infezione pregressa; HAV, HBV, HCV, HIV, borreliosi risultavano negative. Il 15/05/03 il paziente ha lamentato vomito e dolori epigastrici per circa 4 giorni. Alla nostra osservazione il paziente era apiretico. Linfadenomegalie: cavo ascellare bilateralmente (½ cm); retronucleare sx e sottoauricolare sx (1 cm), dolenti alla palpazione. Assenza di congiuntivite e di epato-splenomegalia. Esame neurologico negativo.

Il 24/07/03 gli esami ematochimici e della funzionalità epatica risultavano normalizzati; le sierologie per HAV, HBV, HCV, HIV, borreliosi (EIA), TBE (EIA) risultavano negative; per *E. (Anaplasma) phagocytophila* (IFA): Ac HGE IgG assenti, Ac HGE IgM presenti, titolo 320 (normalità < 20), permettendo la diagnosi di HGE. Il paziente è stato trattato con doxiciclina 100 mg BID per 10 giorni con progressiva regressione della sintomatologia. La sierologia di controllo (14/01/04) ha evidenziato: Ac HGE IgG presenti titolo 64 (normalità < 64), Ac HGE IgM presenti, titolo 40 (normalità < 20).

Il sospetto di HGE deve essere sempre posto in un soggetto con una sindrome simil-influenzale che riferisce morso di zecca in zona endemica.

P013

LA DIAGNOSTICA DI *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* NELLA PRATICA QUOTIDIANA. ESPERIENZA VENEZIANA NEGLI ANNI 2001 - 2003, DALLA DIAGNOSI ALLA PREVENZIONE.

Bergamasco M.*, Ghio L.***, Marchese G.**, Gion M.**

*Laboratorio Analisi chimico - cliniche e microbiologiche Ospedale Civile di Venezia,

** Servizio Igiene e Sanità Pubblica ULSS 12 Veneziana.

Dal 2001 negli Ospedali di Venezia e di Mestre è entrato in

uso la ricerca immunocromatografica urinaria per un antigene di *Legionella pneumophila*. Questo test è raccomandato dalla Circolare ministeriale 400.2/199/5708 del 29/12/1993 assieme all'isolamento da materiale organico (secrezioni respiratorie, broncolavaggio, tessuto polmonare, essudato pleurico, essudato pericardio e sangue), che rappresenta il gold standard della diagnostica e all'aumento di 4 volte del titolo anticorpale specifico verso *Legionella pneumophila* di tipo 1 tra due sieri prelevati a distanza di almeno 10 giorni.

Materiali e metodi

Per questioni di praticità, di velocità e di affidabilità è stato adottato il kit diagnostico Now *Legionella* commercializzato da Analitica triveneta che sfrutta una metodica immunocromatografica.

Nel giro di 15 minuti è possibile valutare la presenza dell'antigene urinario di *Legionella pneumophila* di tipo 1. Questo consente di fornire al clinico, in tempi rapidi, una diagnosi sicura in presenza di lesioni radiografiche inequivocabili e di una sintomatologia, non solo di tipo respiratorio acuto (tosse e febbre), ma anche di tipo neurologico (cefalea e confusione mentale) che è caratteristico nel decorso acuto di questa infezione. Le urine vanno raccolte in un contenitore sterile e conservate a temperatura ambiente se l'analisi viene eseguita entro 24 ore, in alternativa, si conservano in frigorifero a 2 – 8 ° fino ad un massimo di 14 giorni.

Al momento dell'analisi le urine devono essere a temperatura ambiente. Il test prevede di intingere un tampone nel campione di urina, di infilarlo nella card apposita e di consentire la corsa cromatografica aggiungendo 2 gocce del reagente A (tampone citrato/fosfato addizionato con Twen 20 e azide) fornito dal kit. Dopo 15 minuti si può valutare il test osservando che ci sia sempre la banda del controllo positivo. Il test non è valido se manca la banda di controllo. Un ulteriore accorgimento è di far scaldare le urine a 100° per 5 minuti, quando la banda del campione è debolmente positiva. Il test eseguito dopo questo trattamento si rivela più nitido, in quanto le eventuali proteine che possono interferire col test sono così denaturate.

Questo test ha una specificità, una sensibilità e un'accuratezza del 95 %.

Poiché è rivolto verso l'antigene di *Legionella* di tipo 1, che è presente in natura nell'85 % dei casi, sono possibili dei test negativi in presenza di altri tipi di Legionellosi.

Casistica

Fino a tre anni or sono nel territorio della Asl 12 sono stati diagnosticati e notificati al Servizio Igiene e Sanità Pubblica solo pochi casi di legionellosi, in genere nell'ambito del sistema di sorveglianza europeo EWGLI (stranieri che hanno soggiornato in Italia). Nel 2002 e 2003 sono invece stati notificati rispettivamente 29 (9 in non residenti) e 14 (2 in non residenti) casi di malattia dei Legionari. Mediante accurate indagini epidemiologiche realizzate dal SISP si è potuto escludere che i pazienti abbiano avuto un'esposizione comune. È molto probabile che la disponibilità del test di ricerca immunocromatografica urinaria per un antigene di *Legionella* sia uno dei motivi che ha causato l'aumento dei casi di malattia dei legionari. Non è tuttavia da escludere che anche la maggior "sensibilità" del personale medico a porre diagnosi di polmonite da *Legionella* o l'adozione di protocolli che prevedono l'utilizzo del test urinario possano spiegare l'incremento succitato. Dal momento in cui si è reso disponibile il test, presso gli ospedali dell'ASL 12 (Mestre e Venezia) sono stati effettuati: 93 accertamenti nel 2001, 204 nel 2002 e 373 nel 2003. Tra questi 6 (pari al 6,4%) sono risultati positivi o debolmente positivi nel 2001, 24 (11,7%) nel 2002 ed infine 14 (4%) nel 2003.

Dalle notizie anamnestiche si è potuto evidenziare che alla positività del test corrispondeva nello stesso paziente una

sintomatologia ben delineata e tipica della legionellosi, mentre spesso non si è potuto individuare delle esposizioni che rendessero ragione della patologia in esame. Per completezza è opportuno rilevare che solo in pochi casi e sempre nelle strutture recettive le indagini effettuate sull'ambiente ci hanno permesso di isolare la *Legionella* in "matrici" ambientali.

P014

BATTERIEMIE IN ETÀ PEDIATRICA E NEONATALE: INCIDENZA DELLE INFEZIONI NOSOCOMIALI IN UN OSPEDALE PEDIATRICO NEL BIENNIO 2002-2003.

*Bernaschi P., **Portanova A., *Lucignano B., *Chiavelli S., *Menichella D.

*U.O. Laboratorio di Microbiologia
Osp. Pediatrico Bambino Gesù di Roma
**C.I.O. Direzione Sanitaria
Osp. Pediatrico Bambino Gesù di Roma
Piazza S. Onofrio 4 Roma 00165

Scopo. Stimare l'incidenza di batteriemie verificatesi, in un ospedale pediatrico, dopo aver adottato il sistema di sorveglianza delle Infezioni Nosocomiali secondo la definizioni di "caso" dei CDC di Atlanta.

Materiali e metodi. Nel biennio considerato sono pervenute nel nostro laboratorio 19255 campioni di emocolture con sospetto di batteriemia, provenienti dalle diverse aree di degenza. I dati sono stati elaborati con il software "Epicenter". Sono stati utilizzati i seguenti flaconi della Becton Dickinson: per la ricerca di germi Aerobi- flaconi *BACTEC Peds Plus/F n.* (tappo rosa); per la ricerca di germi Anaerobi - flaconi *BACTEC Lytic/F Anaerobi* (tappo viola); per la ricerca di Miceti- flaconi *BACTEC Mycosis-IC/F* (tappo verde).

Le batteriemie considerate significative sono quelle relative all'isolamento da emocultura di un reale patogeno in relazione al numero dei prelievi eseguiti e alle evidenze cliniche.

Sono state definite "Infezioni Ospedaliere" le batteriemie significative insorte almeno 48 ore dopo il ricovero ospedaliero.

Risultati. Sono risultate positive 2514 emocolture (13%). Sono state diagnosticate 523 batteriemie significative pari al 21% dei casi studiati, di queste 347 sono Infezioni Ospedaliere, ovvero il 13,8% dei casi studiati.

Complessivamente si è osservata una incidenza delle batteriemie ospedaliere pari al 66,3%, le batteriemie comunitarie sono pari al 33,6%.

Sono stati individuati 583 microrganismi responsabili di batteriemie; nelle "ospedaliere" prevalgono i germi gram positivi (27,9%), i gram negativi sono il 22,7%, miceti 9,3% e le polimicrobiche sono il 6,8%. In quelle "comunitarie" prevalgono i germi gram positivi (15,4%), i gram negativi sono il 12,4%, miceti 0,9%, anaerobi 0,5% e le polimicrobiche sono il 4,4%.

Conclusioni. I rilievi epidemiologici, in termini di numero di episodi infettivi e batteriemie significative, in relazione al numero dei ricoveri hanno evidenziato differenze significative tra le diverse aree di degenza. Le aree a maggior rischio sono rappresentate dalle Aree Intensive.

P015

INDAGINE CONOSCITIVA INTERREGIONALE SULLA RICERCA COLTURALE DI *CAMPYLOBACTER* SPP.

Bernieri F.¹, Merlino L.¹, Agnello M.¹, Buratta A.¹, Borsotti M.², Quercioli M.², Rossetti R.³, Crotti D.⁴

¹U.O. Qualità e Appropriatelyzza dei Servizi Sanitari, Direzione Generale Sanità, Regione Lombardia.

²Centro Regionale di Riferimento per il Controllo della Qualità in Laboratorio, A.O. Careggi, Firenze.

³Laboratorio di Microbiologia P.O. di Pistoia.

⁴Sezione di Microbiologia e Parassitologia Clinica, Ospedale "R. Silvestrini", Perugia.

Nei Paesi sviluppati *Campylobacter* spp. è tra i più frequenti microrganismi patogeni intestinali. Numerosi studi indicano che in Italia la sua prevalenza è sovrapponibile a quella di *Salmonella* spp.; nonostante ciò quest'ultima spesso è più spesso isolata nei comuni laboratori diagnostici. Questo, presumibilmente, per due motivi; il primo è che molti laboratori non ricercano di routine *Campylobacter* nelle feci malgrado che tale ricerca sia esplicitamente indicata alla voce "Coprocultura" nei nomenclatori tariffari sia nazionale sia regionali; il secondo è che la coltura di questo microrganismo, tecnicamente, risulta un poco più complessa di quella di *Salmonella*.

Nell'ambito dei rispettivi programmi di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ) in Microbiologia sia la Regione Lombardia, sia il Centro Regionale di Riferimento per il Controllo della Qualità Toscana hanno più volte inviato ai laboratori iscritti dei campioni fecali simulati contenenti un ceppo di *Campylobacter jejuni/coli*. Spesso le risposte fornite sono risultate poco soddisfacenti, nei casi migliori solo circa l'80% dei laboratori ha risposto correttamente. Per cercare di evidenziare le cause di un numero così elevato di fallimenti si è ritenuto di inviare un ceppo noto di *Campylobacter jejuni* e contestualmente richiedere ai laboratori notizie circa le tecniche colturali adottate.

Tra la fine di marzo e gli inizi di aprile 2004 a circa 480 laboratori delle regioni Lombardia, Toscana, Umbria, Marche, Abruzzo e Basilicata è stato inviato il ceppo, liofilizzato, *Campylobacter jejuni* ATCC 33291. Si è richiesto di effettuare la coltura, fornire il risultato della medesima e di indicare, su un apposito questionario, le metodiche colturali (tipo di terreni di prima semina, eventuali arricchimenti, modalità di incubazione), le metodiche di identificazione (test utilizzati, eventuali kit diagnostici) e le metodiche di saggio della sensibilità ai chemioantibiotici (metodica utilizzata, antibiotici saggiati). Vengono esposti e commentati i risultati.

P016

CAMPYLOBACTER: BIOTIPI PREVALENTI ED ANTIBIOTICO-RESISTENZE.

Bonanno C.L., De Sandro M.V., La Marca A.*, Spanò A., Lanciano A.L.

Servizio di Microbiologia-Ospedale "S. Pertini"- Roma
*BIOS S.p.A.

La *Campylobacteriosi* come altre infezioni enteriche è sottoposta già da tempo a studi di sorveglianza epidemiologica (Programma CAMPYG-AMCLI): conoscere la diffusione

del *Campylobacter* nel nostro Paese oltre che monitorare la sua antibiotico resistenza ha importanti risvolti sia in campo preventivo che terapeutico. Considerata l'attuale e crescente resistenza di questi microrganismi verso antibiotici fino ad oggi normalmente utilizzati in terapia, si è voluta saggiare la sensibilità agli antibiotici di ceppi di *Campylobacter*, di isolamento umano, pervenuti dal Gennaio 2001 al Luglio 2003 presso il nostro Laboratorio, quale Centro di Riferimento del *Campylobacter* per la Regione Lazio.

Materiali e metodi: durante il periodo in esame sono stati raccolti ed esaminati 80 ceppi di *Campylobacter* provenienti da campioni fecali di pazienti prevalentemente in età pediatrica. Tali ceppi sono stati tipizzati e antibiogrammati previa crescita di questi su terreno selettivo Campy BAP(BD). La biotipizzazione è stata effettuata seguendo la tecnica di Lior; la sensibilità agli antibiotici invece è stata testata con metodo di diffusione K.B. su agar M.H. al 5% di sangue di montone.

Risultati: Il *C. jejuni* è risultato prevalente rispetto al *C. coli*, essendo stato isolato nel 77.5% dei casi, mentre il *C. coli* nel 22%, confermando la prevalenza già accertata a livello nazionale. La distribuzione dei biotipi evidenzia una maggiore diffusione del biotipo I nel *C. jejuni* (% 62.9) così come nel *C. coli* (%72.2); il *C. jejuni* biotipo II è stato isolato nel 33.9 % dei casi, il *C. coli* biotipo II nel 27.8 % , il *C. jejuni* biotipo III invece solo nel 3.2%. Per quanto riguarda la antibiotico resistenza il *Campylobacter* ha dimostrato bassi valori di resistenza verso i macrolidi (eritromicina): *C. jejuni/coli* 7.5%, in particolare 3.2% per il *C. jejuni* e 22.2% per il *C. coli*. La resistenza invece verso i chinoloni (acido nalidixico e ciprofloxacina) si conferma elevata anche nella nostra indagine sia nel *C. jejuni* (33.8% per NA e 37% per CIP) che nel *C. coli* (55.5% per NA e CIP). Nei confronti di tetracicline, infine, in generale il *Campylobacter* ha mostrato una discreta sensibilità: per *C. jejuni/coli* è 30% con valori superiori per *C. coli* (44.4%) rispetto al *C. jejuni* (25.8%), così come altri dati in letteratura riportano.

Conclusioni: I risultati ottenuti sono concordi con quelli riportati da altri autori: *C. jejuni*, biotipo I, è l'agente eziologico predominante delle gastroenteriti da *Campylobacter*. Inoltre i test di sensibilità mostrano tetracicline e soprattutto macrolidi (E) come molecole privilegiate nella terapia antibiotica. Dalla nostra indagine la resistenza ai chinoloni (CIP) rimane alta nel periodo considerato anche se si assiste ad un leggero decremento nell'anno 2002.

P017

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI VRE MEDIANTE SISTEMA AUTOMATIZZATO RIBOPRINTER® E PFGE: CONFRONTO TRA LE METODICHE

Bonfitto M.G.; Catalano A.; Frisicale L.; Piana F.; Fossati L.; Marchiaro G.

SC Microbiologia ASO San Giovanni Battista c.so Bramante 88 - 10126 Torino

Introduzione. Gli enterococchi resistenti ai glicopeptidi (VRE) rappresentano un problema emergente a livello di sanità pubblica non soltanto perché associati a fenomeni di multiresistenza che, rendendo inefficaci quasi tutte le terapie antibiotiche a disposizione, aumentano morbidità e mortalità dei pazienti colpiti, ma anche perché è dimostrato sperimentalmente che i geni della resistenza alla vancomicina possono essere trasferiti ad altre specie microbiche, in particolare a *S. aureus*, con gravi conseguenze.

La Pulsed Field Gel Electrophoresis è considerata la tecnica "gold standard" per la tipizzazione dei VRE, essa, però, presenta lo svantaggio di avere lunghi tempi di esecuzione (circa una settimana).

Il sistema automatizzato Riboprinter® è stato sviluppato per la ribotipizzazione batterica ed è in grado di effettuare analisi automatiche in Southern blot. Esso fornisce risultati in una giornata lavorativa con un impegno del personale di circa un paio d'ore.

Scopo del lavoro. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la riproducibilità del sistema RiboPrinter® per la tipizzazione automatizzata dei VRE e di confrontarne i risultati con quelli ottenuti utilizzando il sistema di tipizzazione manuale PFGE.

Materiali e metodi. A tale scopo sono stati tipizzati sia con la PFGE che con il sistema RiboPrinter® 41 ceppi di *Enterococcus faecium* vancomicina resistenti fenotipo VanA isolati da vari materiali clinici provenienti da 41 pazienti diversi, inviati presso il laboratorio di Microbiologia Clinica dell'A.S.O. S. Giovanni Battista di Torino e identificati mediante sistema Microscan ed Api Strep.

La tipizzazione in PFGE è stata eseguita mediante l'utilizzo dell'enzima *Sma*1 e seguendo il protocollo descritto altrove, mentre il sistema RiboPrinter® l'enzima *Eco*R1.

L'analisi dei patterns è stata effettuata mediante il software Bionumerics 2.5 per la rivelazione dei clusters.

Risultati. La riproducibilità dei metodi è stata valutata ripetendo gli esperimenti su 10 ceppi ed entrambi i metodi hanno riconfermato i profili evidenziati dalla precedente seduta analitica.

La PFGE ha individuato 24 diversi pulsotipi aventi un numero di bande compreso tra 10 e 14. Sono stati trovati 6 clusters (con indice di similarità del 100% cioè in raggruppamenti costituiti da profili identici): 1 da 7, 1 da 6 ceppi, 1 da 4, 3 costituiti da 2 ceppi. L'indice di clusterizzazione è risultato essere 57.5%.

Il sistema RiboPrinter®, invece, ha individuato 3 profili diversi: il 114-S-1, presente in 32 ceppi, il 25-S-1 con 7 ceppi ed il 202-S-5 con 1 solo ceppo. L'indice di clusterizzazione è risultato essere 97.5 %.

Confrontando i risultati ottenuti con le due metodiche, si è notato che è necessaria una differenza tra i ceppi di almeno il 20% affinché il sistema automatico possa identificarli come diversi.

Entrambi i metodi hanno identificato un ceppo come *Enterococcus gallinarum*, permettendo di correggere l'identificazione errata da parte dei metodi tradizionali.

Conclusioni. Il sistema automatizzato RiboPrinter® è inficiato da un elevato indice di clusterizzazione (97,5% vs 57,5%), ha però il vantaggio di fornire risultati in breve tempo (una giornata lavorativa vs una settimana) e con minore impegno da parte dell'operatore.

Confrontando con un proprio database il profilo ottenuto dalla tipizzazione di un ceppo, inoltre, può dare rapidamente una identificazione di genere e specie con maggiore affidabilità rispetto ai metodi di identificazione tradizionali.

BIBLIOGRAFIA.

1. Kuriyama T, et Al. (J Med Microbiol. 2003 Sep;52(Pt 9):821-7). Molecular characterization of clinical and environmental isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from a teaching hospital in Wales.
2. Price CS et Al. (J Clin Microbiol. 2002 May;40(5):1858-61). Comparison of an automated ribotyping system to restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis for differentiating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates.

P018

LE LINFOADENOPATIE INFETTIVE: NOSTRA ESPERIENZA

Sanlorenzo M.*; Caldera D.*; Lasagna C.*; Bruno R.*; Pecarrere J.L.***

* A.S.L. 7 Chivasso (To)

° Equipe Sanitaria Ospedale di Sakalalina (Madagascar)

*** Istituto "Pasteur" di Antananarivo (Madagascar)

Introduzione: Le linfoadenopatie di origine infettiva rappresentano un importante problema clinico in ambiente tropicale, in considerazione anche delle difficoltà diagnostiche per mancanza di strumentazione idonea.

Vogliamo presentare la nostra esperienza in questo campo analizzando retrospettivamente i dati raccolti presso l'Ospedale di Sakalalina (Madagascar) nel periodo 1991-1992.

Materialie metodi: Nel periodo considerato presso la struttura ospedaliera sono state effettuate in 36 pazienti biopsie di linfonodi per definire meglio le patologie o i sospetti diagnostici. La sede di prelievo è stata in 21 casi a livello delle stazioni linfonodali del mesocolon trasverso, in 9 casi a livello latero-cervicale, in 6 casi a livello inguinale.

Il materiale raccolto veniva sottoposto ad esame microscopico sia a fresco sia dopo colorazione di Gram e Ziehl-Neelsen per evidenziare la eventuale presenza di microrganismi patogeni; inoltre veniva fissato con liquido di Bouin per il successivo esame istologico.

Risultati: La ricerca è stata positiva in 13 casi (36%).

In cinque pazienti l'esame istologico ha evidenziato un'adenite tubercolare follicolare e caseofollicolare: in tutti questi casi però la ricerca di BAAR è risultata sempre negativa.

Altri cinque soggetti hanno presentato una linfoadenite cronica con presenza di numerose uova di *Schistosoma mansoni* (bilarziosi linfonodale).

In due soggetti è stata riscontrata a livello dei linfonodi la presenza di *Wuchereria bancrofti*.

Infine un paziente ha presentato un quadro di micosi linfonodale con l'evidenziazione di formazioni a "grani" di origine actinomicotica.

Conclusioni: Nella nostra esperienza è stato riscontrato un elevato numero di soggetti positivi per una linfoadenite infettiva (13/36 pazienti). Vi sono difficoltà oggettive nella diagnostica, che richiede la presenza di un attrezzato laboratorio analisi e di un servizio di anatomia patologica, il che difficilmente è a disposizione in strutture situate in paesi tropicali. Ciò fa ritenere che tali patologie siano ancora sottostimate. L'elevato numero di soggetti con adenite tubercolare o con bilarziosi linfonodale correla bene con la diffusione di questi agenti patogeni in Madagascar e in particolare nella regione di Sakalalina, dove la prevalenza di *Schistosoma mansoni* supera il 75% nella popolazione.

P019

PROTOCOLLO PER LA PREVENZIONE DELL'INFEZIONE NEONATALE DA STREPTOCOCCO BETA-EMOLITICO DI GRUPPO B (SGB)

Busetti M., Antonucci G., Macorini D., Serra P.

UCO Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Trieste, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

Introduzione: l'infezione da Streptococco beta-emolitico di

gruppo B (SGB) rappresenta un'importante causa di morbosità e mortalità neonatale. In gravidanza la colonizzazione da SGB a livello vaginale e/o intestinale è frequente; la trasmissione verticale avviene prevalentemente al momento del travaglio e del parto, e può essere prevenuta mediante una profilassi antibiotica intrapartum. Dal luglio 2001 presso l'IRCCS "Burlo Garofolo" di Trieste è attivo un protocollo multidisciplinare per la prevenzione dell'infezione neonatale da SGB.

Obiettivo: valutare la prevalenza della colonizzazione da SGB alla 35a-37a settimana di gravidanza; valutare l'adesione al protocollo, in termini di frequenza del campionamento per SGB in gravidanza.

Materiali e metodi: alle donne tra la 35a e la 37a settimana di gravidanza venivano prelevati un tampone rettale ed uno vaginale. Ciascuna coppia di campioni veniva inoculata in brodo selettivo (Lim broth) e terreno selettivo (CNA). Il brodo veniva subcoltivato in una piastra di agar sangue dopo 18-24 ore. Le piastre venivano esaminate dopo 24 e 48 ore; le colonie beta-emolitiche o non emolitiche, Gram+ e catalasi negative, venivano identificate mediante test biochimici e sierologici.

Risultati: nel periodo luglio 2001-dicembre 2003 sono stati eseguiti 2712 campionamenti per SGB; sono risultate positive 454 (16,7%) coppie di campioni. L'adesione al protocollo è stata stimata comparando il numero di campionamenti annui con il numero medio di parti espletati presso il nostro Istituto (1800/anno). Nel secondo semestre 2001 sono stati effettuati 411 campionamenti, pari a circa il 46% dei parti; nel 2002 sono stati eseguiti 970 campionamenti, pari al 54% delle gravidanze; nel 2003, 1331 campionamenti, pari al 74% dei parti.

Conclusioni: la prevalenza della colonizzazione da SGB in gravidanza nella nostra area è risultata attorno al 17%. L'adesione al protocollo inizialmente è stata bassa (attorno al 50%); tra i motivi, la scarsa diffusione del protocollo a livello extra-ospedaliero (consultori, ambulatori privati). Nel corso del 2003, grazie ad una maggiore diffusione a livello territoriale, l'adesione è migliorata (74%), pur non essendo ancora a valori ottimali.

P020

DIAGNOSI DI INFEZIONE DA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* IN GIOVANI DONNE MEDIANTE METODICHE DI AMPLIFICAZIONE

Busetti M., Antonucci G., Macorini D., Serra P., Falcomer N.

UCO Igien e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Trieste, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

Introduzione: *Chlamydia trachomatis* è uno dei più diffusi patogeni a trasmissione sessuale. La maggior parte delle infezioni sono asintomatiche ma, se non trattate, possono causare cerviciti, uretriti e malattia infiammatoria pelvica (PID) e, a lungo termine, infertilità, dolore cronico pelvico e gravidanze ectopiche. La prevalenza è particolarmente elevata nelle adolescenti e nelle giovani di età inferiore a 25 anni sessualmente attive.

Obiettivi: valutare la prevalenza dell'infezione da *Chlamydia trachomatis* in donne sintomatiche di età inferiore o uguale ai 25 anni; valutare la sintomatologia associata all'infezione.

Materiali e metodi: nel periodo marzo 2000 - dicembre 2003, alle donne di età inferiore a 25 anni afferenti agli ambulatori dell'IRCCS "Burlo Garofolo" di Trieste con sintomi associabili a infezioni genitali sono stati effettuati, oltre

agli accertamenti di routine, un tampone cervicale e/o uretrale per la ricerca di *Chlamydia trachomatis*. Il test è stato effettuato tramite due metodiche di amplificazione: LCR per la ricerca di DNA (LCx Abbott) da marzo 2000 a giugno 2003, TMA per la ricerca di RNA ribosomale (Gen-Probe, BioMérieux) da luglio a dicembre 2003.

Risultati: nell'arco di tempo considerato, sono stati testati campioni da 193 pazienti di età tra i 14 e i 25 anni; di queste 23 (11,9%) sono risultate positive.

Dei 23 soggetti con infezione accertata, 10 (43,5%) presentavano una sintomatologia aspecifica (bruciore, prurito, leucorrea, spotting); nel 26,1% dei casi la ricerca era stata effettuata per sospetta PID, nel 30,4% per altre cause (ad es. infezione del partner).

Conclusioni: pur trattandosi di una popolazione selezionata, la prevalenza dell'infezione da *Chlamydia trachomatis* è risultata piuttosto elevata, ed i sintomi spesso aspecifici. L'uso di metodiche di amplificazione che associano all'elevata sensibilità una semplicità di esecuzione e costi contenuti, potrebbe favorire l'introduzione di programmi di screening nelle adolescenti sessualmente attive asintomatiche, per prevenire le complicanze a lungo termine, come raccomandato da numerose organizzazioni internazionali (CDC: raccomandazione "A").

P021

TIPIZZAZIONE DI *YERSINIA* MEDIANTE ELETTROFORESI IN CAMPO PULSATO E RAPD-PCR

Cabodi D., Franzin L., Bonfrate N.

Osp. Amedeo di Savoia, Torino

Introduzione: In Italia i biosierotipi patogeni più diffusi di *Yersinia enterocolitica* (Ye) sono 4/O:3 e 2/O:9. Lo scopo del lavoro è la tipizzazione di ceppi di *Yersinia* di origine umana con elettroforesi in campo pulsato (PFGE) e RAPD-PCR a fini epidemiologici.

Metodi: 11 ceppi Ye 4/O:3, 2 Ye 2/O:9 e 7 Ye 1A/10,34, isolati nel nostro Laboratorio da pazienti sintomatici, sono stati tipizzati con PFGE e RAPD-PCR. PFGE è stata effettuata trattando il DNA batterico incluso in agar con proteinasi K (2mg/ml) e con enzimi di restrizione *NotI* e *XbaI*. La migrazione è stata effettuata su gel d'agarosio 1% con CHEF DRIII impiegando quattro condizioni di migrazione differenti. Dopo trattamento della sospensione batterica con Chelex 10%, RAPD-PCR è stata eseguita con due differenti primers. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide, colorato con nitrato d'argento.

Risultati: L'interpretazione dei risultati di PFGE presenta difficoltà legate al numero elevato di frammenti ottenuti. I risultati migliori sono stati osservati con l'enzima *NotI* che fornisce un bandeggio più chiaro rispetto ad *XbaI*. I profili ottenuti risultano omogenei all'interno dei tre biosierotipi, ma differenti fra loro. I risultati della RAPD-PCR confermano quelli ottenuti con la PFGE. I due metodi utilizzati evidenziano l'uguaglianza dei profili per due Ye 4/O:3, isolati da madre e figlio, e per due Ye 1A/10,34, isolati da feci e muco-sa di un bambino.

Conclusioni: Entrambe le tecniche risultano essere strumenti importanti nella tipizzazione batterica di *Yersinia* e nel riconoscimento di eventuali correlazioni epidemiologiche. I risultati sembrano consigliare una combinazione dei due metodi al fine di ottenere una migliore e più facile interpretazione dei dati.

P022**INDICATORI DI QUALITA' E DI OUTCOME IN MICROBIOLOGIA CLINICA: UN ESEMPIO APPLICATO ALLA DIAGNOSTICA DELLE UROCOLTURE**

Camporese A., Boschian M., Grosso S., Favero L., Zigante P., Tizianel G.

S.O. di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica
Azienda Ospedaliera "S.Maria degli Angeli" - Pordenone

Nel campo dell'assistenza sanitaria gli indicatori consistono in variabili che consentono di descrivere fenomeni complessi, fornendo indicazioni sulla qualità dei processi analizzati e sull'*outcome* che l'applicazione dei processi stessi è in grado di produrre nel miglioramento dell'assistenza, consentendo al tempo stesso di prendere decisioni in merito al mantenimento o alla revisione di specifiche azioni o procedure.

Nel momento in cui si è trattato di acquisire nuovi strumenti ad elevata automazione e di mettere a punto il sistema informatico del laboratorio ci si è posti l'obiettivo di cercare di modificare non solamente il flusso analitico *tout court*, ma contestualmente tutta la gestione del lavoro della microbiologia, per assicurare un minore *Turn Around Time* (TAT) e un incremento dell'impatto clinico della risposta durante tutto l'arco della giornata e della settimana.

Una diversa distribuzione del lavoro e la riduzione dei tempi di risposta a seguito dell'introduzione dell'automazione in microbiologia insieme a un'estesa informatizzazione è potenzialmente in grado di consentire, infatti, anche la revisione gestionale delle diverse aree diagnostiche permettendo di recuperare personale da destinare a turni di lavoro diversificati rispetto al passato e distribuiti nell'arco di tutta la giornata e per tutta la settimana.

Lo scopo del presente lavoro è consistito nel valutare a posteriori, attraverso l'individuazione di un indicatore di qualità e di *outcome*, quanto le nuove tecnologie analitiche e i cambiamenti gestionali introdotti nel nostro laboratorio abbiano effettivamente influito in termini di potenziale miglioramento del servizio reso all'utenza e al clinico nella gestione delle malattie infettive delle vie urinarie (IVU).

Prendendo spunto dai processi di cambiamento analitici e organizzativo-gestionali intervenuti nel nostro laboratorio si è dunque deciso di provare a misurarne l'efficacia nell'ambito della diagnostica delle urinocolture, valutando i risultati ottenuti nel biennio 2002/2003 su un totale di 30.785 urinocolture eseguite, utilizzando come indicatore di qualità e di *outcome* quanto richiesto in termini di TAT dalle *European Urinalysis Guidelines*.

Il documento di indirizzo europeo, infatti, suggerisce alcuni importanti parametri qualitativi di riferimento per misurare l'impatto clinico del risultato microbiologico nelle IVU consentendo al microbiologo di rapportarsi in qualsiasi momento per valutare il proprio *outcome* e la qualità della propria gestione diagnostica.

Dall'analisi degli *outcomes* riferiti in tabella, estrapolati dai dati del biennio 2002/2003, emerge la conferma dell'efficacia degli obiettivi che ci eravamo prefissati all'inizio del processo di cambiamento organizzativo: con l'uso dell'automatizzazione, dell'informatica e attraverso la revisione dei flussi analitici e degli orari di lavoro è infatti possibile fornire oggi un'identificazione e un antibiogramma di un microrganismo (e dunque una diagnosi clinica) con un TAT medio che nel caso delle urinocolture si posiziona non solo entro i termini previsti dai valori attesi dall'indicatore ma, per quanto riguarda i test di sensibilità, in termini di efficienza addirittura superiori.

Il TAT medio ottenuto è inoltre reso clinicamente ancor più rilevante dalla disponibilità del collegamento LIS con i reparti di degenza che rende disponibile il referto a video in tempo reale, abbattendo il tempo tradizionalmente richiesto per il trasferimento cartaceo.

I risultati ottenuti rispetto all'autorevole riferimento utilizzato come indicatore per la misura dell'*outcome* ci consentono di confermare che tutto il processo di cambiamento analitico-gestionale ha influito efficacemente sulla qualità diagnostica del nostro Servizio di Microbiologia secondo un processo strategico del tutto nuovo, nell'ambito del quale l'appropriatezza analitica e i controlli di qualità rappresentano solo uno degli elementi, certamente essenziali, di un progetto molto più ampio di qualità globale che non può prescindere dall'importanza del tempo analitico, sul quale si basa la vera "novità" in termini di efficienza, di efficacia e di "impatto clinico" del moderno *management* di un servizio di microbiologia.

P023**ISOLAMENTO DI STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE E RELATIVI FENOTIPI DI RESISTENZA IN BAMBINI SANI SOTTOPOSTI A VACCINAZIONE CON VACCINO CONIUGATO EPTAVALENTE**

Camporese A., Albano G., Bruschetta G., Diamante P., Gobbo M., Romeo A., Tizianel G.

S.O. di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica
Azienda Ospedaliera "S.Maria degli Angeli" - Pordenone

La presenza di *Streptococcus pneumoniae* a livello nasofaringeo in bambini asintomatici è un evento relativamente frequente che è stato correlato con il potenziale sviluppo di malattie delle vie respiratorie e con la possibile trasmissione e diffusione del microrganismo. Al tempo stesso è stato riferito un aumento degli isolamenti dal nasofaringe di ceppi resistenti soprattutto nei primi anni di età rispetto ai soggetti adulti (1).

Nel corso di una campagna vaccinale su base volontaria in bambini in età pre-scolare con vaccino eptavalente coniugato si è inteso valutare, prima di procedere alla vaccinazione, quanti bambini risultassero portatori sani di *Streptococcus pneumoniae*. In una fase successiva si è invece valutato quanti risultassero positivi in due successivi controlli dopo la vaccinazione e se i ceppi isolati nelle sedute successive differissero in termini fenotipici da quelli del primo isolamento, in modo da suggerire una persistenza del ceppo nativo piuttosto che una successiva reinfezione.

Nel periodo ottobre-novembre 2002 sono stati arruolati su

INTERVENTO MISURATO	VALORE ATTESO (INDICATORE)**	CONFORMITA' (SI/NO) DELL'OUTCOME ALL'INDICATORE
Identificazione in coltura pura	Il 90% dei ceppi entro 24 ore	SI
Identificazione in coltura mista	Il 90% dei ceppi entro 48 ore	SI
Antibiogramma su ceppi significativi	Il 98% dei ceppi entro 48 ore	SI (il 90% anche dopo 30 ore)

** Kouri T., Fogazzi G., Gant G., Hallander H. et al. *European Urinalysis Guidelines*. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2000; 60:1-97.

base volontaria 191 bambini sani, di età compresa tra i 3 e i 5 anni, provenienti da diverse strutture scolastiche e tutti residenti in ambiente cittadino.

Il prelievo per la ricerca di *Streptococcus pneumoniae* è stato eseguito, sulla base di linee guida già validate da altri analoghi studi (2), mediante tampone nasofaringeo con *mini-culturette* flessibile extra sottile.

Il tampone così ottenuto è stato direttamente inoculato in ambulatorio su piastre di Columbia Agar + 5% di sangue di montone (Kima), incubate successivamente in atmosfera al 5% di CO₂ per 24 ore.

I ceppi isolati sono stati identificati mediante catalasi, bile solubilità, sensibilità all'optochina e confermati con Pneumo-Kit (Biomerieux). Tutti i ceppi sono stati stoccati a -80°C per le indagini di siero-genotipizzazione. Dopo l'avvenuta vaccinazione, tutti i bambini risultati positivi al primo prelievo sono stati sottoposti nuovamente a tampone nasofaringeo in due successive fasi, a tre e a sei mesi di distanza.

I test di sensibilità sono stati eseguiti secondo le regole NCCLS (3) mediante agar diffusione secondo Bauer & Kirby. Per quanto riguarda la sensibilità alla penicillina, tutti i ceppi con aloni di inibizione all'oxacillina > 20 mm sono stati considerati sensibili, mentre quelli con aloni <20 sono stati sottoposti ad E-test (Biolife) per la valutazione della MIC, discriminante per valutare il livello di refrattarietà ai beta lattamici. Per il controllo di qualità interno è stato utilizzato il ceppo di controllo ATCC 46919.

Oltre alla penicillina, è stata testata la sensibilità a cefaclor, ceftriaxone, eritromicina, rokitamicina, tetraciclina, cloramfenicolo, cotrimossazolo, levofloxacin.

Dall'indagine è emersa nella popolazione esaminata una notevole diffusione di *Streptococcus pneumoniae* (110 ceppi isolati su 191 esaminati, pari al 57.5% di positività), molto superiore a quella rilevata in analoghe recenti indagini (1), con un'elevata percentuale di ceppi sensibili a tutte le molecole testate (65.5%) rispetto ai ceppi che presentavano almeno una resistenza (34.5%).

Su 191 bambini esaminati, 58 sono stati sottoposti a vaccinazione. Tra questi, 39 (67.2%) sono risultati ancora positivi nei prelievi successivi, con una distribuzione così articolata: 13 (33.3%) positivi al secondo e terzo prelievo, 8 (20.5%) solo al secondo e negativi al terzo, mentre 18 (46.1%) si sono negativizzati al secondo prelievo per positivizzarsi nuovamente al terzo prelievo.

Dei 39 bambini con persistente positività, 19 (48.8%) hanno dimostrato nei mesi successivi alla vaccinazione ceppi con fenotipo di resistenza analogo, mentre nei restanti 20 (51.2%) sono stati isolati ceppi fenotipicamente diversi.

Il livello di resistenza alla penicillina sul totale degli isolati nella sessione pre-vaccinale è risultato pari all'8.2%, quello dell'eritromicina è risultato invece pari al 12.8% e quello di rokitamicina è stato stimato al 5.5%, con un'evidente dissociazione di sensibilità tra macrolidi a 14 atomi e a 16 atomi che rifletterebbe la prevalenza di un meccanismo di refrattarietà ai macrolidi a pompa di efflusso, analogo a quello rilevato in *Streptococcus pyogenes* fenotipo M.

Tra i diversi antibiotipi rilevati si è confermata la frequente associazione tra resistenza all'eritromicina e a tetraciclina (il 12.8% sul totale degli isolati), mentre la refrattarietà al cotrimossazolo è risultata la più elevata sul totale degli isolati (22.7%). Nessun ceppo è risultato resistente alla levofloxacin.

Tra i vari *patterns* di sensibilità, il confortante ridotto livello di resistenza alla penicillina (8.2%) si colloca intorno ai parametri recentemente riferiti anche da altri Autori (1,4), mentre per quanto concerne la ridotta refrattarietà all'eritromicina, pari al 12.8%, si nota una notevole difformità in percentuale sia rispetto ai più elevati livelli evidenziati in recenti segnalazioni (1), sia nei confronti dei risultati riferiti a livello nazionale dal gruppo Gispneumo (4).

L'elevata diffusione di *Streptococcus pneumoniae* in bambini sani di età pre-scolare conferma l'interesse per una ulteriore diffusione della pratica vaccinale. Il discreto livello di positività evidenziata nei prelievi eseguiti nei mesi successivi alla vaccinazione, peraltro, è di stimolo per approfondire le caratteristiche siero-genotipiche dei ceppi isolati, in modo da valutare se il fenomeno possa riferirsi prevalentemente a fenomeni di reinfezione (suggeriti in prima istanza da un discreto numero di ceppi con antibiotipi diversi rispetto al primo isolamento) piuttosto che a persistenza dei ceppi nativi.

P024

ISOLAMENTO DI *CORYNEBACTERIUM GLUCURONOLYTICUM* DA LIQUIDO SEMINALE

Caporaso F., Roberto G., Galdo V.

Laboratorio Patologia Clinica, Distretto Sanitario ASL AV2, C.da Tiratore Atripalda (AV)

Negli ultimi anni, alcune nuove specie di Corinebatteri sono stati isolati dal tratto urogenitale maschile umano ed animale. In particolare il *Corynebacterium glucuronolyticum*, specie non lipofila, è stata isolata in Francia nel 1995 da pazienti tutti di sesso maschile, con infezioni del tratto genitourinario. Dei dodici ceppi isolati, uno proveniva dall'urina di un paziente febbrile, uno da un paziente affetto da HIV, tre dall'uretra e sette dallo sperma di soggetti infertili. Noi riportiamo l'isolamento presso il nostro laboratorio del *Corynebacterium glucuronolyticum* dal liquido seminale di un paziente di 39 anni, sposato con 2 figli, che non presentava nessuna sintomatologia in particolare; la spermio-coltura gli era stata prescritta dall'andrologo per problemi di eiaculazione precoce.

Materiali e metodi Il campione di liquido seminale è stato seminato a 37°C per 48 ore sulle piastre di Agar MacConkey, Agar Sale mannitolo, Agar TSS (Tripase Soja al 5% di sangue di montone), Agar Cioccolato, Agar Gardnerella (In anaerobiosi, sistema GENBAG, Biomerieux) e a 30°C su Agar Sabouraud. La prova biochimica di identificazione del corinebatterio è stata eseguita con API-CORYNE (Biomerieux). L'antibiogramma è stato eseguito col metodo di Kirby-Bauer su piastre di Mueller Hinton.

Risultati L'esame culturale ha dato esito positivo solo sull'Agar TSS e Agar Gardnerella, dove si sono sviluppate colonie bianco avorio, piccole, convesse, formate da batteri Gram Positivi, con morfologia claviforme ed una disposizione tipica a V. Ai tests biochimici le colonie sono risultate catalasi, beta glucuronidasi e pirazinamidasi positive e hanno prodotto acido dal glucosio e dal saccarosio. L'idrolisi dell'esculina e la fosfatasi alcalina sono risultati negativi.

La sensibilità agli antibiotici testati è risultata in linea con la letteratura; aminoglicosidi, macrolidi, glicopeptidi, cefalosporine di III generazione e chinoloni sono risultati sensibili; le uniche resistenze evidenziate riguardano la fosfomicina e l'azitromicina.

Conclusioni È auspicabile un maggior impegno per l'isolamento del *Corynebacterium glucuronolyticum* per poter definire il suo eventuale ruolo nella patogenesi dell'infertilità o dell'eiaculazione precoce.

P025

DIAGNOSI MICROBIOLOGICA DELLE INFEZIONI CERVICO-VAGINALI: RISULTATI DI UN ANNO DI ESPERIENZA

Carcheri M., Riva R., Graziani G., Lacitignola G., Oliveri C., Ventura A., Zanin C., Capuzzo R.

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche -
"Azienda Ospedaliera Villa Scassi"
Corso O. Scassi, 1 16149 Genova

Scopi. Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la frequenza di isolamento di microrganismi in campioni di essudato vaginale e cervicale raccolti nell'arco di un anno (2003) presso il Centro Prelievi Microbiologici del Laboratorio Analisi dell'A.O. Villa Scassi.

Materiali e Metodi. Il gruppo delle pazienti prese in esame, suddiviso in fasce d'età, comprende 418 pazienti sulle quali è stato eseguito un tampone vaginale e 154 sulle quali è stata eseguita una indagine a livello cervicale. L'essudato vaginale è stato sottoposto a misurazione del pH, microscopia a fresco e dopo colorazione di Gram, *fishy-odor test* e quindi seminato su terreni per la ricerca di germi e miceti (Blood Agar/Slanetz, Choc. Agar/MTH/ColumbiaCNA, McConkeyMUG/Chromalbicans) e in terreno liquido per *Trichomonas*. I campioni cervicali sono stati seminati sugli stessi agar e in brodo liquido per la ricerca dei Micoplasm. La ricerca di *C.trachomatis* è stata eseguita con una metodica di Biologia Molecolare.

Risultati. *Candida albicans*. è stata isolata nel 16.0% dei campioni vaginali. *Trichomonas* nel 3.3%, *Gardnerella vaginalis* nel 5.5%. Nel 36.3% dei casi è stata riscontrata una situazione riconducibile a dismicrobismo con pH vaginale alterato (43.7%) e deplezione della flora lattobacillare (40.9%). La positività del *fishy-odor test* è stata del 6.4%. Nel 19.8% è stata riscontrata la presenza di "clue cells". Altri germi (Enterobatteriacee, Streptococco agalactie, ecc.) sono stati isolati in percentuali variabili. In alcuni casi è stata riscontrata una condizione di lattobacillosi.

Su di una percentuale del 38.8% di donne sintomatiche sottoposte a tampone cervicale, nel 37.0% del totale è stato isolato *Ureaplasma urealyticum*, mentre l'amplificazione genica ha evidenziato la presenza di *C.trachomatis* nel 2.6% dei campioni esaminati.

Conclusioni. *Candida albicans* si conferma il microrganismo più frequentemente isolato nei casi di alterazione del microbiota vaginale mentre la percentuale di isolamento di *Trichomonas vaginalis* risulta piuttosto bassa. La percentuale di positività del *fishy-odor test* (6.4%) corrisponde alla percentuale di isolamento di *Gardnerella vaginalis* (5.5%). Da sottolineare come la maggior parte dei risultati ottenuti con i tamponi vaginali indichino una condizione di dismicrobismo (36.3%) con alterazione del pH e deplezione della flora lattobacillare. Per quello che riguarda i tamponi cervicali è da segnalare l'elevata frequenza di isolamento di *U.urealyticum* e la non bassa percentuale di riscontro, tramite indagini di biologia molecolare, di *C.trachomatis*.

P026

BATTERI E RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI IN QUATTRO RIANIMAZIONI ROMANE

²Carletti M., ²Carducci G., ¹Gallo M.T., ³Fontana C.,
⁴Ballardini M., ⁵Testore G.P.

¹I.F.O. San Gallicano IRCCS

²OBPG-IRCCS Lab. Analisi Palidoro

³Uni. Tor Vergata-Microbiologia

⁴ACO S.F.Neri UOC Microbiologia

Introduzione e scopo del lavoro

Le infezioni in Terapia Intensiva (TI) rappresentano una delle problematiche di maggior rilievo, principalmente a causa degli effetti sulla morbidità, mortalità, tempi di degenza e costi. L'alta incidenza e l'etiologia, data in gran parte da microrganismi multiresistenti, sono degli aspetti, oggetto di continua discussione, allo scopo di migliorare gli standards di controllo e prevenzione.

In questo studio si sono voluti osservare i microrganismi maggiormente coinvolti nelle infezioni in 4 Rianimazioni romane.

Materiali e metodi

Identificazioni ed antibiogrammi sono stati eseguiti nel periodo 1999-2003 su materiali clinici provenienti dalla Terapia Intensiva, mediante sistemi automatici (Vitek, Bio-Merieux e Phoenix, BD) e riuniti in un unico database.

Risultati

Per quanto riguarda i microrganismi maggiormente coinvolti, il nostro studio ha rilevato l'isolamento più frequente dei gram negativi (59%), rispetto ai gram positivi (41%). Tra i gram positivi significativo è l'aumento di stafilococchi oxacillino-R (dal 72% all'85%), soprattutto nelle emocolture e nei broncoaspirati; tra i gram negativi, lo *P. aeruginosa*, isolato nel 41% dei casi, ha mostrato una diminuzione di resistenza nei confronti della piperacillina (da 68% a 27%) ed un aumento della resistenza nei confronti dell'imipenem (da 27% a 45%). Tra gli ESBL produttori, significativo è l'aumento di *Klebsiella spp* (dal 15% al 93%) ed il suo aumento di resistenza nei confronti della ciprofloxacina.

Conclusioni

Tra i microrganismi isolati, l'aumento significativo degli Stafilococchi evidenzia l'importanza di una accurata sorveglianza microbiologica e la messa in atto di misure di prevenzione rivolte al personale di assistenza, al fine di limitare l'insorgenza di infezioni da patogeni opportunisti.

BIBLIOGRAFIA:

1. Testore G.P., Gallo M.T., Ballardini M., Carletti M., Malvatani S., Falco S., Raponi G. :2001-2002 Batteri e resistenze agli antibiotici in sei rianimazioni romane. Minerva Anestesiologica Sett. 2003, vol.69, suppl.2 n.9

P027

ANALISI DEL PROFILO DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI CEPPI DI STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLATI PRESSO L'OSPEDALE "S. M. GORETTI" DI LATINA

Tega L., Leggeri L., Raieta K., Carraturo A.

Servizio di Patologia Clinica, P.O. "S. M. Goretti", AUSL Latina

Obiettivi Il recente isolamento di ceppi nosocomiali di *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistenti è l'ultimo di

una catena d'eventi che hanno reso la resistenza agli antibiotici uno dei problemi sanitari di maggiore rilevanza mondiale. Inoltre, i ceppi MRSA sono divenuti una delle principali cause di infezione in ambiente ospedaliero. Questo studio ha come obiettivo la valutazione dell'antibiotico-resistenza di ceppi del genere *Staphylococcus*, appartenenti alle specie maggiormente isolate presso l'Ospedale di Latina e responsabili di infezioni invasive. La finalità di tale lavoro è comprendere meglio le basi epidemiologiche e biologiche del fenomeno.

Materiali e metodi Sono stati isolati, nel periodo che va dal 01/08/2002 al 31/07/2003, presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale "S. M. Goretti" di Latina, 311 stipti di *Staphylococcus* spp.: 87 ceppi, pari al 27,97% del totale, rappresentati da stafilococchi coagulasi-positivi e 224 ceppi, pari al 72,03%, identificati come stafilococchi coagulasi-negativi. I ceppi sono stati isolati da materiali vari (tamponi faringei, tamponi urogenitali, t. auricolari, urine, sangue, espettorato) provenienti da pazienti ospedalizzati. Tutti gli stipti sono stati identificati in base a proprietà biochimiche attraverso il sistema automatico Vitek (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) utilizzando le card GPI e testando la sensibilità agli antibiotici con card GPS 523.

Risultati Gli stipti maggiormente isolati sono rappresentati dallo *Staphylococcus aureus* con 87 ceppi (27,97%) e dallo *Staphylococcus epidermidis* con 85 ceppi (27,33%). Minor frequenza d'isolamento è stata riscontrata per *Staphylococcus haemolyticus* con 39 ceppi (12,54%) e *Staphylococcus hominis* con 32 ceppi (10,29%). Tutti gli stipti isolati di *Staphylococcus aureus* sono risultati sensibili alla vancomicina e alla teicoplanina. La resistenza verso l'oxacillina (ceppi MRSA) è stata pari al 44,74%, mentre la resistenza verso i macrolidi (eritromicina) è risultata del 55,26%. La sensibilità verso i fluorochinoloni (ciprofloxacina) è risultata del 46,05%, mentre il 96,05% dei ceppi sono risultati sensibili al Trimetoprim/Sulfametossazolo. Le percentuali di antibiotico-resistenza in *Staphylococcus epidermidis* sono spesso risultate diverse da quelle di *Staphylococcus aureus*. Degna di nota è la resistenza verso l'oxacillina, pari all'85,71%, il doppio di quella dello *Staphylococcus aureus* (44,74%). Per quanto riguarda l'eritromicina la percentuale di ceppi resistenti è stata del 42,86%, mentre il 19,05% dei ceppi ha presentato una sensibilità intermedia. La resistenza al trimetoprim/sulfametossazolo è stata del 71,43%, mentre nello *Staphylococcus aureus* è risultata pari soltanto al 3,95%. Inoltre, è da notare la maggiore resistenza verso la ciprofloxacina (74,60%). Lo *Staphylococcus haemolyticus* ha mostrato una resistenza verso l'oxacillina pari all'84,62%; anche la resistenza verso la ciprofloxacina è stata elevata (79,49%) mentre il trimetoprim/sulfametossazolo è risultato sensibile nel 41,03% dei ceppi. L'eritromicina, infine, si è mostrata attiva soltanto verso il 17,85% dei ceppi testati. Gli stipti di *Staphylococcus hominis* hanno mostrato una resistenza elevata sia verso la ciprofloxacina (62,96%) che verso l'eritromicina (81,48%) e l'oxacillina (88,89%). Essi hanno presentato una elevata sensibilità verso la gentamicina (81,48%) e la clindamicina (96,30%).

Conclusioni Dal confronto di questi dati con quelli del territorio nazionale emerge l'estrema variabilità dell'antibiotico-resistenza con conseguente necessità di personalizzare la terapia sulla base di dati certi riferiti all'agente patogeno e alle caratteristiche dell'ospite, riducendo l'impiego di antibiotici di ultima generazione solo in quei casi in cui non sono disponibili terapie di pari efficacia basate sull'utilizzo di molecole meno recenti e di più consolidato uso.

P028

ISOLAMENTO DI *F. NECROPHORUM* COME CAUSA DI SINDROME DI LEMIERRE

Idda L.*, Castiglia N.*, Masala M.A.°, Burrai M.°, Milia S.°, Puggioni M. F.°, Merella G.°, Cherchi G.B.*

* Laboratorio di Analisi chimico cliniche e Microbiologia

Ospedale Civile "SS. Annunziata" Sassari

° Divisione di Medicina I Ospedale Civile

"SS. Annunziata" Sassari

La sdr. di Lemierre costituisce una infrequente ma grave complicanza di infezione faringo-tonsillare. Il caso da noi osservato riguarda un paziente di sesso maschile, dell'età di venti anni, forte fumatore e bevitore, dedito all'uso di droghe leggere; nel settembre del 2003 in seguito all'improvvisa insorgenza di faringodinia con febbre continuo-remittente con acme di 40.7 °C, il medico curante prescriveva terapia antibiotica con amoxicillina, sostituita in terza giornata con piperacillina/tazobactam. Il quadro clinico andava arricchendosi di nuovi sintomi quali dispnea con tosse scarsamente produttiva e adenite laterocervicale sinistra. Si decideva a questo punto il ricovero in ambito internistico dove si accertava la presenza di un esteso focolaio polmonare medio-basale destro, leucocitosi neutrofila, incremento della VES. Veniva a questo punto intrapresa terapia antibiotica: claritromicina per os, che veniva sostituita, per insuccesso, con ciprofloxacina. Emocolture seriate e tamponi faringei eseguiti presso il Laboratorio del nosocomio presso il quale era avvenuto il ricovero davano esiti negativi, mentre aumentava la estesa tumefazione latero-cervicale; si evidenziava mediante TC collo e torace una trombosi pressoché completa della giugulare interna sn., estendentesi alla vena succlavia e brachiocefalica omolaterale con infiltrati diffusi a livello polmonare. Il paziente ormai polipnoico, obnubilato, in stato soporoso, veniva trasferito all'Ospedale Civile SS. Annunziata di Sassari presso il reparto di Rianimazione. Venivano qui eseguite emocolture seriate e colture dell'aspirato bronchiale, con copertura antibiotica e.v. ad ampio spettro: teicoplanina, imipenem, aztreonam, fluconazolo ed eparina a basso peso molecolare. Dopo due giorni di trattamento, in seguito al miglioramento delle condizioni generali, il paziente veniva trasferito presso il reparto di Medicina dove veniva fatta diagnosi di sdr. di Lemierre ed impostata terapia e.v. con piperacillina-tazobactam, metronidazolo, gentamicina ed eparina a basso peso molecolare. A conferma del sospetto diagnostico dall'Unità Operativa di Microbiologia del Laboratorio Analisi veniva comunicata la positività di una delle emocolture inviate: la identificazione di un *fusobacterium necrophorum*, confermata poi anche con metodiche molecolari presso l'Istituto Superiore di Sanità cui veniva inviato il ceppo, permetteva la definitiva conferma diagnostica, mentre il paziente andava incontro a rapido miglioramento delle condizioni generali.

P029

MIOCARDITE DA *L. MONOCYTOGENES* IN PAZIENTE CON OSTRUZIONE CORONARICA

Castiglia N.*, Idda L.*, Baule G.°, Melis A.°, Cherchi G.B.*

* Laboratorio di Analisi chimico cliniche e Microbiologia Ospedale

Civile "SS. Annunziata" Sassari

° Divisione di Medicina III Ospedale Civile "SS. Annunziata" Sassari

Il caso clinico oggetto del presente lavoro riguarda un

paziente di sesso maschile, dell'età di 66 anni, con familiarità negativa per patologie cardiovascolari, ex fumatore, non storia di potus, né diabete e/o dislipidemie e/o patologie di rilievo all'anamnesi patologica remota. Ricoverato nel novembre 2003 presso la divisione di cardiologia dell'Ospedale SS. Annunziata di Sassari per sindrome coronaria acuta con ostruzione IVA prossimale, venivano riscontrati i seguenti valori ematochimici: VES 47, PCR 19, leucocitosi neutrofila (11.000 GB con >70% N); buona la funzionalità renale ed epatica. Ad un non riuscito tentativo di disostruzione coronarica, in attesa di intervento di by-pass aorto-coronarico si accompagnava rialzo termico con febbre elevata >38°C. All'ecocardiogramma, in assenza di focolai polmonari ed ecotomografia addominale nella norma, si rilevava lieve ipertrofia parietale e presenza di versamento pericardico lieve-moderato; sulla base di tali riscontri si eseguivano numerosi prelievi venosi seriati per esami emoculturali e contemporaneamente veniva avviata terapia antibiotica ad ampio spettro con cefalosporine di terza generazione, teicoplanina per via ev ed acido acetilsalicilico ad alte dosi; a distanza di otto giorni non si rilevava alcun beneficio clinico ed anzi si manifestava progressivo aumento del versamento pericardico con segni di tamponamento cardiaco associato a grave anemia normocromica normocitica (Hb 6.2 g. x dl.). Trasferito presso il reparto di Medicina per ulteriori accertamenti e sottoposto ad emotrasfusione ed ulteriori esami culturali, si isolava da una delle emocolture inviate all'unità operativa di Microbiologia clinica del Laboratorio analisi ospedaliero una *Listeria monocytogenes*. Tale rilevazione rendeva possibile formulare la diagnosi di miocardite infettiva da *Listeria* e permetteva il corretto orientamento di una terapia antibiotica combinata mirata con penicillina ed aminoglicosidi per quattro settimane. Già in seconda giornata era possibile osservare una buona risposta clinica e, dopo un mese di terapia, il paziente veniva dimesso in ottime condizioni, con nessun segno di versamento pericardico; attualmente esita modesto ispessimento pericardico ed è stato programmato intervento di rivascolarizzazione miocardica.

P030

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI MRSA MEDIANTE UTILIZZO DI RIBOPRINTER®, RAPD E PFGE: ANALISI COMPARATIVA

Catalano A., Bonfitto M.G., Piana F., Cirillo D.M., Marchiaro G.

SC Microbiologia ASO San Giovanni Battista cso Bramante 88 - 10126 Torino

Introduzione. Gli MRSA sono una causa persistente di infezioni nosocomiali a decorso grave. L'identificazione precoce di cloni "ospedalieri" è fondamentale per la sorveglianza negli ospedali di tutte le infezioni da MRSA. La caratterizzazione dei ceppi permette di rilevare tempestivamente eventuali microepidemie ed istituire le misure di controllo necessarie per arrestarle. In particolare la possibilità di ottenere un profilo genotipico (fingerprint) di ogni singolo isolato consente di delineare con certezza il percorso interumano dei ceppi. Negli ultimi anni sono state proposte diverse tecniche per la genotipizzazione tra le quali la ribotipizzazione automatica mediante Riboprinter®, la *Random Amplified Polymorphic DNA* e la *Pulsed Field Gel Electrophoresis*.

Scopo del lavoro. Lo scopo di questo lavoro è stata la valutazione delle 3 tecniche elencate sopra secondo diversi parametri quali la rapidità e la semplicità di esecuzione, la capacità discriminatoria e la riproducibilità dei dati.

Materiali e metodi. A tale scopo sono stati tipizzati 77 ceppi di MRSA isolati da materiali patologici, 69 dei quali provenienti da reparti diversi dell'Ospedale Maggiore San Giovanni Battista di Torino e 8 da ospedali esterni.

La tipizzazione in PFGE è stata eseguita mediante l'utilizzo dell'enzima *Sma*I e seguendo il protocollo descritto altrove, mentre il sistema Riboprinter® l'enzima *Eco*RI.

La RAPD è stata effettuata con i primer forniti dal kit Ready-To-Go™ RAPD Analysis Kit (Amersham Biosciences) e seguendo le procedure indicate dal produttore.

L'analisi dei patterns è stata effettuata mediante il software Bionumerics 2.5 per la rivelazione dei clusters.

Risultati. L'analisi eseguita mediante RAPD ha permesso di individuare 35 profili differenti (costituiti da un numero di bande compreso tra 1 e 5), all'interno dei quali 56 ceppi sono stati inclusi in 14 clusters con indice di similarità del 100% cioè in raggruppamenti costituiti da profili identici. I 14 clusters sono costituiti 1 da 11 ceppi; 1 da 9; 1 da 7; 1 da 5; 1 da 4; 2 da 3 e 7 da 2 ceppi. L'indice di clusterizzazione è risultato essere 72.7% (56 ceppi/77)

L'analisi mediante PFGE ha evidenziato, invece, 45 pulsotipi differenti all'interno dei quali 45 ceppi sono stati inclusi in 14 clusters (IS=100%) formati a loro volta da 1 cluster da 7; 1 da 6; 1 da 4; 6 da 3 e 5 da 2. L'indice di clusterizzazione della PFGE è 58.4%

La ribotipizzazione automatica mediante Riboprinter® ha individuato 16 ribotipi. I cluster rilevati dal Riboprinter® sono stati 7: il ribotipo 19-S-6 comprende 16 ceppi, il 90-S-1 37, il 207-S-2 3, 4 il 90-S-8, 2 il 210-S-4, 4 il 105-S-7, 2 il 19-S-1. L'indice di clusterizzazione è stato del 88.3%.

Esperimenti ripetuti hanno evidenziato l'ottima riproducibilità della PFGE e del Riboprinter® mentre la riproducibilità ottenuta mediante la tecnica del random priming si è rivelata insufficiente. Per quanto riguarda i tempi di esecuzione sono risultati prolungati per la PFGE (una settimana) mentre la metodica RAPD permette di ottenere una tipizzazione in una giornata lavorativa; infine la tipizzazione mediante Riboprinter® abbina ai tempi rapidi di esecuzione la quasi completa automatizzazione.

Per quanto riguarda i costi essi risultano modesti per la RAPD, medio-alti per la PFGE, mentre sono rilevanti per il sistema automatizzato Riboprinter®.

Conclusioni. Lo studio comparato di tali metodiche ci ha permesso di confermare quanto noto in letteratura: la metodica PFGE è il "gold standard" per lo studio epidemiologico degli MRSA, mentre il Riboprinter®, pur essendo di rapida e semplice esecuzione ed evidenziando un'ottima riproducibilità del sistema, si è dimostrata una tecnica meno discriminante i cui risultati devono essere confermati dalla PFGE. Il sistema automatico può essere utilizzato come metodica di screening su numerosi ceppi. Infine la RAPD si è dimostrata una metodica applicabile a epidemie di differenti patogeni.

BIBLIOGRAFIA:

1. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R. V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis; criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiology*. 1995; 33:2233-2239.
2. Prevost G., Jaulhac B., Piemont Y. DNA fingerprint by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *S.aureus* isolates *J Clin Microbiology* 1992; 30: 967-73.
3. Saulnier P., Bourneix C., Prevost G., Andremon A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strain of methicillin-resistant *S.aureus* *J Clin Microbiology*. 1993; 31: 1964-70.

P031

UTILIZZO DEL SISTEMA AUTOMATIZZATO VIDAS LMO2 PER LA RICERCA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN CAMPIONI CLINICI

Cattai N.⁽¹⁾, Vaiani R.⁽²⁾, Locatelli W.⁽³⁾, Rossi G.⁽³⁾
Chiappa L.⁽⁴⁾, Gianfranceschi M.⁽⁵⁾

⁽¹⁾Laboratorio di Sanità Pubblica ASL Lecco,

⁽²⁾Laboratorio di Microbiologia AO Lecco,

⁽³⁾Direzione ASL Lecco, ⁽⁴⁾Direzione Sanitaria AO Lecco

⁽⁵⁾Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari ISS

Listeria monocytogenes, batterio trasmesso ingerendo cibi contaminati, può dare sepsi, infezioni a livello del sistema nervoso centrale e aborto settico. Recentemente è stato dimostrato che la listeriosi si manifesta anche come infezione gastrointestinale non invasiva.

Per facilitare la ricerca di *L. monocytogenes* nei casi di gastroenteriti, che esula dalla pratica routinaria, abbiamo cercato di dimostrare la possibile estensione del campo di applicazione del sistema automatizzato ELFA VIDAS LMO2 (bioMérieux), validato AFNOR per le matrici alimentari, a campioni fecali.

Sono state allestite una coltura di *L. monocytogenes* e una di *L. innocua* ad una concentrazione di 10^8 cellule/ml, da cui sono state prodotte diluizioni fino a raggiungere concentrazioni di 30 cellule/ml finali. 5 campioni di feci sono stati contaminati con diluizioni delle due colture a concentrazioni di 30, 150, 300, 750, 1500, 3000 cellule/ml. I campioni sono stati inoculati in 9 ml di brodo half-fraser; un'aliquota di feci è stata inoculata senza contaminazione artificiale. Dopo incubazione a 30°C per 24 h si è proceduto all'analisi con il sistema immunoenzimatico e semina nel terreno cromogeno Rapid[®]L mono (Bio-Rad), anche questo validato per le matrici alimentari. 2 campioni inoculati con la diluizione più bassa di *L. monocytogenes* sono risultati negativi con il sistema immunoenzimatico dopo 24 ore, ma positivi dopo altre 24 ore di incubazione, mentre tutti gli altri sono risultati positivi. I campioni senza inoculo e quelli inoculati con *L. innocua* sono sempre risultati negativi. L'esame colturale ha confermato questi risultati.

I risultati ottenuti indicano che il sistema automatizzato VIDAS LMO2 risulta sensibile e specifico, fornisce risposte in tempi brevi e richiede un impegno di tempo minimo da parte dell'operatore.

Questo lavoro è preliminare ad un progetto per valutare, utilizzando sia il sistema automatizzato VIDAS che il terreno cromogeno, la prevalenza di *L. monocytogenes* in patologie gastroenteriche nella provincia di Lecco, ricerca epidemiologicamente importante se si tiene conto che nel 2003 all'Ospedale di Lecco sono state ricoverati 4 casi di sepsi da *Listeria*.

P032

STUDIO DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA DI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ISOLATI DA TAMPONE FARINGEO NEL TERRITORIO DELLA AUSL/LE1

Autori: B. Ciannamea¹, M. Megha¹, G. Miragliotta², A. Mosca²

¹Unità Operativa di Microbiologia e Virologia AUSL/LE1

²Sezione di Microbiologia, Dip. MIDIM,

Università di Bari, P.zza G. Cesare, 70124 Bari

Streptococcus pyogenes è ancora oggi responsabile della

maggior parte delle faringotonsilliti batteriche acute.

Scopo: Monitoraggio della resistenza antibiotica di ceppi di *S. pyogenes* isolati nel territorio della AUSL/LE1.

Materiali e Metodi: Nel periodo 01/2003 – 01/2004 sono pervenuti presso il Poliambulatorio della AUSL/LE1, 145 tamponi faringei per la ricerca di *S. pyogenes*. I campioni sono stati seminati su CNA agar sangue con l'aggiunta del dischetto di Bacitracina e incubati 18 h a 37°C in CO₂ 5%. Per l'identificazione è stato utilizzato il test al lattice per la ricerca del gruppo A mentre per il test di sensibilità sono stati utilizzati i pannelli API STREPT (bioMérieux).

Risultati: vedi tabella

	SENSIBILI (%)	INTERMEDI (%)	RESISTENTI (%)
CLORAMFENICOLO	12 (75)	0 (0)	4 (25)
TETRACICLINA	8 (50)	0 (0)	8 (50)
ERITROMICINA	4 (25)	0 (0)	12 (75)
CLINDAMICINA	10 (63)	0 (0)	6 (38)
VANCOMICINA	16 (100)	0 (0)	0 (0)
PENICILLINA	16 (100)	0 (0)	0 (0)
LEVOFLOXACINA	15 (94)	1 (6)	0 (0)
CEFOTAXIME	16 (100)	0 (0)	0 (0)

Conclusioni: 16/145 (11%) tamponi faringei sono stati positivi per la ricerca di *S. pyogenes*, tutti isolati da soggetti con diagnosi di faringotonsillite. La percentuale di ceppi eritromicina resistenti riscontrata nel territorio è significativamente superiore ai più recenti dati nazionali che si aggirano intorno al 30% ed induce ad una seria riflessione sul possibile ruolo giocato dalla prescrizione di macrolidi con conseguente aumento della pressione selettiva esercitata dagli stessi.

P033

ATTIVITA' " IN VITRO " DI LINEZOLID VERSO ENTEROCOCCI E PNEUMOCOCCI DI ISOLAMENTO CLINICO

Colombo R., Facchini M., Restelli A., D'Accico M., Arosio A., Moschin A., Scarazatti E.

U.O. Microbiologia Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano

Il trattamento delle infezioni batteriche sostenute da Gram positivi è attualmente un problema emergente poiché alcuni di questi patogeni sono divenuti resistenti agli agenti antimicrobici standard. In particolare, la letteratura mondiale è ricca di segnalazioni di ceppi di enterococco resistenti ai glicopeptidi tradizionalmente usati, vancomicina e teicoplanina, di pneumococchi resistenti alla penicillina, di stafilococchi resistenti alla meticillina.

L'emergenza di batteri Gram positivi patogeni multiresistenti giustifica quindi l'attuazione di protocolli mirati a valutare l'efficacia di nuove molecole antibiotiche introdotte in commercio.

Scopo del nostro studio è stato quello di verificare l'attività "in vitro" di un antibiotico da poco commercializzato che appartiene alla classe degli oxazolidinoni, il Linezolid (Pfizer), nei confronti di enterococchi e pneumococchi isolati da campioni biologici di pazienti ricoverati (sangue, dispositivi intravascolari, liquidi peritoneali, ferite chirurgiche, broncoaspirati) o da campioni (urine, espettorati) di pazienti ambulatoriali afferenti alla nostra A.O. nel quadrimestre novembre '03 - febbraio '04.

Risultati. Sono stati isolati 64 ceppi di *S. pneumoniae* e 91 ceppi di enterococco così suddivisi: 76 *E. faecalis*, 14 *E. faecium* e 1 *E. casseliflavus/gallinarum*. Su tutti gli stipti di

pneumococco sono state determinate le MIC con metodica E-test (Biolife) per Linezolid (LZ) e Penicillina, mentre per gli enterococchi sono stati saggiati Linezolid, Vancomicina e Teicoplanina. I risultati ottenuti sono riportati nelle sottostanti tabelle.

<i>S. pneumoniae</i>	S	I	R
<u>Linezolid</u>	≤ 2	-	-
N° ceppi	64		
<u>Penicillina</u>	≤ 0.06	0.12-1	>2
N° ceppi	55	8	1

Enterococchi	S	I	R
<u>Linezolid</u>	≤ 2	4	>8
N° ceppi	88	3*	
<u>Vancomicina</u>	≤ 4	8-16	>32
N° ceppi	88	3°	
<u>Teicoplanina</u>	≤ 8	16	>32
N° ceppi	91		

* 3 *E. faecalis*; ° 2 *E. faecalis*, 1 *E. casseliflavus/gallin*.

Conclusioni. I nostri risultati confermano una buona attività di LZ come farmaco di 2^a scelta sui batteri Gram positivi in caso di isolamento di ceppi resistenti.

P034

PERCENTUALI DI PREVALENZA DI ISOLAMENTO DI CEPPI GRE NELL'ANNO 2003 PRESSO LA MICROBIOLOGIA AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA SENESE NELL'ANNO 2003

Bartolozzi C., Colombini G., Franceschelli S., Banchi S., Corsi E.

Azienda Ospedaliera Universitaria Senese
Via delle Scotte - Siena

I glicopeptidi sono molecole che hanno il loro principale meccanismo di azione sulla sintesi della parete batterica. Infatti formano complessi con la sequenza terminale D-ALA-D-ALA del muramyl pentapeptide del peptidoglicano in allungamento impedendone la sua polimerizzazione. Il primo ceppo di *E. faecium* resistente alla Vancomicina fu isolato in America nel 1986; da allora il numero degli isolati GRE è in continuo aumento. In Italia un'indagine eseguita nel 1995 su alcuni ospedali riporta le seguenti percentuali di resistenza:

-) *E. faecalis* vs Vancomicina 1 - 2 %
-) *E. faecium* vs Vancomicina 0,9 - 32 %.

Sulla scorta di quanto premesso, abbiamo voluto determinare quale fosse la percentuale di prevalenza di ceppi GRE isolati dal nostro laboratorio di Microbiologia presso Azienda Ospedaliera Universitaria senese, nell'anno 2003.

Metodiche utilizzate: 1) identificazioni di specie e profili di sensibilità ottenuti utilizzando il sistema Vitek 2 della ditta Biomerieux. 2) convalida dei ceppi *Enterococcus* spp. resistenti: ripasso su Agar sangue Columbia, quindi test di screening su agar bile-esculina in presenza ed assenza di Vancomicina (6 mcg/ml), ed ETest. La ricerca ha dato i seguenti risultati:

-) il numero dei ceppi di *Enterococcus* spp. isolati nell'anno 2003 sono stati 351 di cui 311 *E. faecalis* e 50 *E. faecium*. Le loro percentuali di prevalenza di resistenza per i glicopeptidi sono risultate le seguenti:

E. faecalis vs Teicoplanina = 2% (MIC = 4 mg/ml per 95% degli isolati)
E. faecalis vs a Vancomicina = 5% (MIC = 4 mg/ml per 95% degli isolati)
E. faecium vs Teicoplanina = 14% (MIC = 4 mg/ml per 72% degli isolati)
E. faecium vs Vancomicina = 40% (MIC = 4 mg/ml per 48% degli isolati)

P035

VALUTAZIONE DELLA FLORA VAGINALE IN DONNE DURANTE IL TERZO TRIMESTRE DI GRAVIDANZA.

* Daghetta L., * Ferrario A., **Ricci S.

*Laboratorio Analisi - Sant'Ambrogio - Vigevano - (PV)

**Centro Medico Franzoso - Vigevano - (PV)

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che gestanti con alterato ecosistema vaginale risultano essere ad aumentato rischio per complicanze gravidiche, quali aborto e/o parto prematuro, infezioni del liquido amniotico, rottura prematura delle membrane, endometriti post-partum e sepsi neonatale.

Particolare rilevanza clinica assumono, da questo punto di vista, la vaginosi batterica e l'infezione da *Streptococcus agalactiae*.

La vaginosi batterica è la più frequente infezione vaginale nelle donne sessualmente attive che si manifesta nel 20 % delle gravide. Può essere definita come una complessa modificazione della flora batterica vaginale con interessamento prevalente di alcune specie quali *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, batteri anaerobi e conseguente soppressione dei *Lactobacilli* fisiologicamente presenti. Lo *Streptococcus agalactiae* è l'agente patogeno più frequentemente isolato in caso di sepsi neonatale precoce e rappresenta la prima causa di morbidità infettiva neonatale nei Paesi Occidentali.

Scopo: obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare la frequenza di isolamento dello *Streptococcus agalactiae* e la presenza di batteri normalmente riscontrati in concentrazioni non rilevanti nell'ecosistema vaginale.

Materiali e Metodi: l'indagine è stata condotta nel periodo compreso fra gennaio 2003 e dicembre 2003 su 215 pazienti (età media 28 anni) asintomatiche durante il terzo trimestre di gravidanza afferenti al nostro centro per effettuare un tampone vaginale. I campioni sono stati seminati su agar sangue CNA e agar Cioccolato incubati in atmosfera di CO₂ a 37°C per 24-48 ore e su Mannitolo, MacConkey, Sabouraud e Rogosa agar incubati in aerobiosi a 37°C per 24-48 ore.

Risultati: le analisi effettuate su 215 pazienti hanno dato esito positivo in 93 casi (43%).

La frequenza dei ceppi isolati è risultata così rappresentata: *Streptococcus agalactiae* 21,5%, *E. coli* 25,8%, *Candida albicans* 43,0%, *Enterococcus faecalis* 9,7%.

Conclusioni: date le evidenze cliniche appare chiara l'importanza di applicare adeguati protocolli per il riconoscimento precoce e il conseguente trattamento delle infezioni in gravidanza. Infatti dai dati in nostro possesso, al fine di ridurre l'incidenza di complicanze, risulta importante segnalare al clinico non solo la presenza di *Streptococcus agalactiae* bensì anche l'aumento di concentrazione batteriche normalmente presenti nella flora endogena.

P036

**STREPTOCOCCUS PYOGENES:
SENSIBILITÀ E RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI
DI CEPPI ISOLATI DA PAZIENTI
AMBULATORIALI NEL TERRITORIO DEL
FORTORE IN PROVINCIA DI BENEVENTO.**

De Conno D.

Laboratorio di Patologia Clinica, Distretto Sanitario n. 23 di
S.Bartolomeo in Galdo, A.S.L. BN 1

Scopo Col presente studio, effettuato durante il 2002-2003 nell'ambito del Distretto Sanitario N. 23 dell'A.S.L. BN 1, si è valutato la frequenza di isolamento di *Streptococcus pyogenes* o di gruppo A da tamponi faringei di pazienti ambulatoriali con sospetta diagnosi di faringotonsillite, nonché la sensibilità e resistenza nei confronti di diverse classi di antibiotici. Lo studio proseguirà nella raccolta di ulteriori dati al fine di tenere costantemente aggiornato l'andamento temporale delle antibiotico-resistenze nel nostro territorio.

Materiali e metodi Circa 320 tamponi faringotonsillari, effettuati da pazienti con sospetta faringotonsillite di età variabile da 2 anni in poi, sono stati seminati su piastra di agar al 5% di sangue di montone, incubati a 37°C per 18-24 ore in aerobiosi. Le colonie sospette presentanti alone di beta-emolisi venivano identificate come *Streptococcus pyogenes* o di gruppo A mediante test di agglutinazione al lattice, previa estrazione enzimatica. La eventuale identificazione rapida biochimica ed il saggio degli antibiotici sono stati eseguiti con metodo semiautomatico mini-API della Ditta bio-Merieux in uso presso il nostro Laboratorio.

Risultati Le frequenza % di ceppi di *Streptococcus pyogenes* isolati è stata del 17,5 % (56/320). I risultati del saggio degli antibiotici sono stati espressi come % di ceppi Sensibili, Intermedi e Resistenti. La sensibilità è risultata del 100% per Penicillina, Ampicillina, Piperacillina, Cefalotina, Cefotaxime, Rifampicina, Vancomicina, Teicoplanina, Nitrofurantoina, Levofloxacina, di circa il 98% per Cefuroxime axetil, del 91,7% per l'associazione Quinupristina-Dalfopristina e per il Cloramfenicolo, del 86,4% per Ciprofloxacina, del 73,2% per Tetraciclina, del 67,9% per Clindamicina, del 66,7% per Cotrimossazolo, del 51,8% per Eritromicina.

Conclusioni Dai dati osservati si evince che nel nostro territorio, come già in letteratura, gli antibiotici più attivi verso lo *Streptococcus pyogenes* risultano i beta-lattamici, quali le penicilline e le cefalosporine, che sono utilizzabili anche in età pediatrica, i chinolonici come la Levofloxacina, i glicopeptidi quali Vancomicina e Teicoplanina. La resistenza dei ceppi isolati verso l'Eritromicina, unico macrolide saggiato, è stata pari a circa il 36%, seguita dalla resistenza alla Clindamicina pari al 32,1%, evidenziando in tal modo valori di resistenza superiori a quanto osservato in Italia secondo le casistiche nazionali dei Gruppi di Studio GISPyo e GISPneumo negli anni dal 1999 al 2002. Pertanto, l'utilizzo dei macrolidi a 14 atomi di carbonio, quale l'Eritromicina, in caso di terapia alternativa a quella dei beta-lattamici, è consigliato dopo valutazione della sensibilità dei ceppi isolati di *Streptococcus pyogenes* mediante antibiogramma.

P037

**SAGGIO DI SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI
CON IL SISTEMA URO-QUICK SU PATOGENI
ISOLATI IN REPARTI DI TERAPIA INTENSIVA**

Roveta S., Cavallini F., Marchese A., Debbia E.A.

Sezione di Microbiologia - DISCAT, Università di Genova,
Largo R. Benzi 10, I 6132 Genova.

Introduzione: In questo studio i patogeni isolati nei reparti di terapia intensiva di un grande ospedale italiano nel semestre settembre 2003 -febbraio 2004 sono stati esaminati con il nuovo sistema rapido Uro-Quick per la determinazione della sensibilità agli antibiotici precedentemente impiegato negli uropatogeni (Roveta et al., 2003). I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con il sistema classico Kirby-Bauer.

Metodologia: L'antibiotico (in concentrazione appropriata) è stato introdotto in una cuvetta Uro-Quick contenente 2 ml di Mueller-Hinton brodo, successivamente sono stati aggiunti 0.5 ml di sospensione del ceppo da saggiare (5×10^5 CFU/ml). Una cuvetta priva di farmaco è stata utilizzata come controllo. Dopo 3 o 5 ore di incubazione (per i ceppi Gram-negativi o Gram-positivi rispettivamente) i risultati sono stati interpretati nel seguente modo: l'assenza di sviluppo indicava sensibilità, mentre una curva di crescita analoga a quella del controllo rappresentava un ceppo resistente. Sui Gram-negativi sono stati saggiati i seguenti antibiotici: ciprofloxacina (CIP), ampicillina (AM), aztreonam (ATM), co-clavulanato (AMC), piperacillina/tazobactam (TZP), cefazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), cefuroxime (CXM), ceftriaxone (CRO), imipenem (IPM), amikacina (AN), gentamicina (GM), e cotrimossazolo (SXT), mentre sui Gram-positivi: CIP, clindamicina (CM), eritromicina (E), IPM, linezolid (LZD), AM o penicillina (P), rifampicina (RA), GM, streptomina (S), tetraciclina (TE), vancomicina (VA), oxacillina (OXA) e SXT.

Risultati: Sono stati saggiati 174 ceppi Gram-negativi con una concordanza media del 93.9% e 238 Gram positivi, con un accordo del 95.6% tra le due metodiche.

Conclusioni: Nei confronti dei principali patogeni (*Enterobacteriaceae* Stafilococchi ed enterococchi) è stato sempre riscontrato un accordo superiore al 90% tra sistema Uro-Quick e Kirby-Bauer. Sulla base di questi risultati l'impiego del sistema rapido Uro-Quick nelle infezioni nosocomiali gravi si rivela un valido aiuto consentendo di determinare rapidamente (3 o 5 ore) la sensibilità agli antibiotici ed instaurare in tempi brevi la terapia più efficace.

P038

**INTERAZIONE SINERGICA DEI GLICOPEPTIDI
CON CEFTAZIDIME E AZITROMICINA NEI
CONFRONTI DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.**

Cavallini F., Roveta S., Marchese A., Debbia E.A.

Sezione di Microbiologia - DISCAT, Università di Genova,
Largo R. Benzi 10, I 6132 Genova.

Obiettivi: *P.aeruginosa* è responsabile di infezioni gravi e letali che possono colpire gli individui immunocompromessi. I glicopeptidi sono antibiotici attivi sui gram-positivi verso i quali la resistenza spontanea è pressoché inesistente; nei gram-negativi l'ingresso dei glicopeptidi è impedito dal

lipopolisaccaride (LPS). È stato ipotizzato che alcuni antibiotici potessero in qualche modo disorganizzare la struttura del LPS e permettere il passaggio di questi antimicrobici all'interno del batterio. Per valutare questa ipotesi e possibili alternative terapeutiche, il ceftazidime (CAZ) combinato con azitromicina è stato saggiato in associazione con sia con vancomicina (VAN) e sia con teicoplanina nei confronti di isolati clinici di *P.aeruginosa*.

Metodologia: Il ceppo è stato fatto crescere a 37°C in brodo fino ad una concentrazione di almeno 10⁹ CFU/ml e seminato su piastre contenenti una concentrazione fissa di VAN (500mg/l) o TEICO(300mg/l) e diluizioni scalari (2x, 4x, 8x, 16x) di CAZ. Dopo incubazione di 48 ore a 37°C sono stati contati i sopravvissuti; i risultati sono stati interpretati come sinergismo (99%), additività (90%) e indifferenza (0-10%) sulla base della riduzione delle CFU/ml ritrovate con gli antibiotici in combinazione rispetto al singolo composto.

Risultati: Il ceftazidime in associazione con la vancomicina ha reagito in modo sinergico in 16/41 casi, additività è stata riscontrata in 17/41 interazioni mentre 8/41 hanno mostrato indifferenza, mentre in associazione con la teicoplanina, il ceftazidime ha reagito in modo sinergico in 4/18, additività si è rilevata in 14/18 casi. L'aggiunta di azitromicina ha incrementato il numero dei sinergismi ottenuti 5/11 e dell'additività 6/11. In nessun caso è stata registrata indifferenza.

Conclusioni: I glicopeptidi hanno interagito in modo favorevole con il ceftazidime combinato con azitromicina nei confronti di *P.aeruginosa*. Queste osservazioni suggeriscono una nuova e interessante opzione per il trattamento di questo patogeno specialmente in situazioni dove questi farmaci possono essere somministrati per via topica.

P039

INCIDENZA DI STAFILOCOCCI METICILLINO-RESISTENTI IN LIGURIA

R. Bandettini¹, M. Lemmi², L. Pescetto¹, A. Scaramuccia¹, R. Bona⁴, L. Santoriello⁵, I. Diotto⁶, G. Dho⁶, L. Rinaldi⁶, M. Magaglio⁶, A. Piana⁶, D. Serra⁷, E. Intra⁷, S. Reali⁸, M. P. Molinari⁹, E. Battolla¹⁰, G. Benini¹⁰, E. Debbia³
Per Amcli Liguria

¹Osp. Gaslini, Genova; ²Osp. Galliera, Genova;

³Università di Genova; ⁴Osp. San Paolo, Savona;

⁵Osp. Santa Corona, Pietra Ligure (SV); ⁶Osp. di Imperia;

⁷Osp. Evangelico Internazionale, Genova;

⁸Osp. di Chiavari-Lavagna (GE); ⁹Osp. San Martino, Genova;

¹⁰Osp. di Sarzana (La Spezia)

La resistenza alla meticillina (MR) negli stafilococchi rappresenta uno dei caratteri che rende più problematica la terapia delle infezioni sostenute da questi patogeni, specie in ambito nosocomiale. Il controllo dell'incidenza di questo parametro è perciò condotto a livello mondiale e locale periodicamente. In questo studio, 10 centri afferenti all'AMCLI Liguria hanno attivato uno studio per verificare l'incidenza di ceppi meticillino resistenti in quest'area. Durante il mese di aprile 2003 sono stati raccolti 476 ceppi di stafilococco ad campioni di pazienti ricoverati nei reparti di Medicina (64.5%), Chirurgia (12.2%) e Unità di Terapia Intensiva (23.3%). I campioni includevano tamponi da ferita (22.3%), prelievi da infezioni delle alte (17.0%) e basse vie respiratorie (15.8%), sangue (11.6%) cateteri venosi (8.0%), e altro (25.3%). MR è stata valutata secondo i suggerimenti dell'NCCLS. La collezione dei ceppi comprendeva 358 *S.aureus* (75.2%), e 118 stafilococchi coagulasi-negativi

(CNS) (24.8%). *S.epidermidis* rappresentava il 56.8% di quest'ultimo gruppo. La meticillina resistenza in *S.aureus* (MRSA) raggiungeva il 63.7% e tra i CNS era il 66.1%. Molti isolati veicolavano resistenze anche ad altre classi di farmaci. In particolare alla MR risultava concomitante la resistenza agli aminoglicosidi, macrolidi-lincosamidi-streptogramine, fluorochinoloni, e tetracicline (46.5%). Tutti i ceppi sono risultati sensibili alla vancomicina e alla teicoplanina. Tra i CNS, il 33,3% è risultato insensibile ad altri farmaci. Questi risultati indicano che in ambiente nosocomiale ligure la resistenza agli antibiotici degli stafilococchi è ampiamente diffusa e necessita di programmi di sorveglianza continua.

P040

STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE ALL'OXACILLINA IN PAZIENTI PEDIATRICI. OSSERVAZIONE NEGLI ANNI 2002 - 2003.

Draghin E., Colombrita D., Foresti I., Caruso A.

Microbiologia Pediatrica, Presidio Ospedale dei Bambini, Azienda Spedali Civili, Brescia

Introduzione

Lo *Staphylococcus aureus* (SA) oxacillina-resistente (Ox-r) rappresenta un tipo di microrganismo sentinella in quanto potenziale responsabile di infezioni nosocomiali in bambini con gravi patologie. L'oxacillina resistenza viene considerata una condizione impegnativa per la terapia antibiotica perché spesso si accompagna a multiresistenza verso aminoglicosidi, macrolidi, chinolonici, per cui una scelta antimicrobica idonea è necessaria così come l'attuazione di misure di controllo appropriate nella pratica assistenziale per limitare la diffusione dei ceppi all'interno dell'ospedale.

I dati epidemiologici italiani ed internazionali degli ultimi anni mostrano una tendenza all'incremento nella prevalenza di infezioni da SA Ox-r non solo in ambiente ospedaliero ma anche sul territorio.

Obiettivi Valutare l'andamento dell'oxacillina resistenza nei reparti dell'Ospedale dei Bambini (Azienda Spedali Civili) di Brescia nel biennio 2002-'03; valutare sempre per lo stesso periodo di tempo la suscettibilità (R/S) dello SA verso le molecole di antibiotici testate.

Materiali e metodi Nel periodo 1/1/2002 - 31/12/2003 sono stati isolati dai vari materiali dei bambini ricoverati sia in reparti medici che chirurgici 384 ceppi di SA (173 nel 2002 e 211 nel 2003). I campioni pervenuti per l'esame microbiologico erano in frequenza decrescente: tamponi nasali, auricolari, faringei, da ferita, oculari, cutanei, da ascesso, vari. Tutti gli isolati sono stati identificati in base alle proprietà biochimiche con il sistema automatico Vitek 2 (bioMérieux), utilizzando per le identificazioni la card ID-GPC e per l'antibiogramma la card GPS 517.

Risultati Le percentuali di resistenza all'oxacillina sono riportate nella tabella:

aa.	Nido	Pat.	Rian.	Orl.	Ch.	Ped.	Ped.	Terr
		Neo.	Ped.	Ped.	Ped.	Ped.	(em.ct)	
2002	10%	28%	9%	18%	8%	8%	1%	18%
2003	1%	25%	18%	3%	1%	5%	2%	5%

Nel biennio considerato le percentuali di resistenza diminuiscono in tutti i reparti compresa ematologia (con immunodepressi, trapiantati) ad eccezione della Rianimazione pediatrica (dal 9 al 18%). La resistenza media per i reparti conside-

rati globalmente passa dal 13 all'8%, mentre per i campioni provenienti dal territorio la resistenza scende dal 9 al 6%. Per quanto riguarda il comportamento verso gli antibiotici più comuni, i ceppi di SA Ox-r mostrano una diminuzione della resistenza solo per gentamicina e tetraciclina, mentre per eritromicina e chinolonici la resistenza è in aumento; al contrario per i ceppi di SA Ox-s i valori di sensibilità sono migliorati (eritromicina da 78 a 81%, gentamicina da 84 a 90%, tutti gli altri antibiotici saggiati hanno avuto un lieve aumento della sensibilità tra il 90 e il 100%).

Conclusioni I dati, relativi al biennio 2002-'03, rispetto a quelli dell'area mediterranea che riportano una resistenza di circa il 40%, indicano che gli SA isolati nel nostro presidio hanno una resistenza all'oxacillina intorno al 13%. La nostra analisi conferma che è necessario disporre dei dati epidemiologici locali per effettuare un corretto approccio terapeutico.

P041

PROPOLI: SENSIBILITÀ DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES* E *AGALACTIAE*

Fabio A. *, Ricci L. *, Beltrami I. *, Polese A. *, Artioli S. *, Ghidoni A. *, Martino A. **

*Arcispedale S. Maria Nuova. Reggio Emilia

**Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche, Biostatistiche. Università di Modena e Reggio Emilia

La propoli è un prodotto resinoso dell'alveare, raccolto dalle api da gemme ed altre parti di piante ed elaborato con particolari enzimi, costituito da una miscela di composti di natura aromatica e fenolica oltre a numerose sostanze eterogenee presenti in percentuali variabili in funzione della stagione e del tipo di vegetazione. Conosciuta dall'antichità, attualmente è disponibile in commercio sotto diverse forme; trova applicazione per uso interno ed esterno, in preparati dermatologici e per il cavo orale. Viene utilizzata per la prevenzione e la cura di affezioni delle alte vie respiratorie come le faringiti. Ad essa sono attribuite varie proprietà tra cui l'efficacia antibatterica soprattutto verso batteri Gram-positivi. Scopo di questo studio è stato quello di valutare e di paragonare l'effetto di tre tipi di tintura idroalcolica di propoli e di un prodotto senza alcool con fruttosio (indicate con le lettere A,B,C,D), presenti in commercio presso erboristerie e/o farmacie, su 30 ceppi di *Streptococcus pyogenes* e 20 di *Streptococcus agalactiae* isolati da tamponi faringei di pazienti ambulatoriali. Sulle piastre, seminate con sospensioni contenenti 0,5 Mc Farland del germe, sono stati deposti dischetti contenenti 10 µl del prodotto misurando dopo 24 h l'eventuale alone di inibizione; sono stati effettuati controlli con le stesse percentuali di etanolo. Il prodotto A non ha inibito *S.pyogenes* ed ha causato aloni di inibizione di 14 mm su 10 ceppi di *S.agalactiae*. I prodotti B e C hanno causato rispettivamente aloni di inibizione di 12 e 16 mm su un ceppo di *S.pyogenes*. Il prodotto D è risultato non inibente ma la crescita di *S.pyogenes* attorno ai dischetti si è accompagnata alla comparsa di aloni di emolisi di 40 mm. Dall'osservazione della bibliografia in materia emergono dati notevolmente contrastanti. Non ci risultano segnalazioni di aloni di emolisi. Ovviamente la diversa combinazione delle sostanze attive nei vari campioni influisce sul potere antimicrobico della propoli nei confronti di microrganismi causa di infezioni delle alte vie respiratorie.

P042

VRE: BREVE INDAGINE DI PREVALENZA IN UN' AZIENDA OSPEDALIERA MILANESE

Facchini M., Colombo R., Arosio A., D'Accico M., Moschin A., Scarzatti E.

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

Sempre più frequentemente vengono segnalati isolamenti da campioni biologici umani e animali di enterococchi vancomicina resistenti (VRE), che uniscono, alla nota multi-resistenza, anche quella verso i glicopeptidi. In alcuni stati rappresentano ormai una realtà emergente sia come causa di infezioni localizzate e sistemiche, che come colonizzanti l'intestino di pazienti sani o ricoverati nelle UTI. Da quest'ultima osservazione deriva un'importanza crescente dei VRE come responsabili di infezioni ospedaliere.

Ci siamo quindi proposti di studiare i ceppi di enterococco isolati nella nostra A.O. per verificare se la sensibilità ai glicopeptidi fosse reale o causata da una sottostima del sistema automatico Vitek-2 (bioMérieux). A questo scopo, nel quadri-mestre nov.'03 - feb.'04 sono stati stoccati per una successiva verifica 91 ceppi di enterococco (76 *E. faecalis*, 14 *E. faecium*, 1 *E. casseliflavus/gallinarum*) isolati sia da infezioni importanti di pazienti ricoverati (sangue, dispositivi intravascolari, liquidi peritoneali, ferite chirurgiche), sia da infezioni modeste in pazienti ambulatoriali. I ceppi sono stati ritestati con E-test (Biolife) per il calcolo delle MIC di vancomicina (Va) e teicoplanina (Tp) espresse in accordo con i criteri NCCLS.

Risultati. Soltanto il ceppo *E. casseliflavus/gallinarum* è risultato resistente alla Va con Vitek (MIC >= 32 µg/ml) ed intermedio con E-test (MIC=6), ma sensibile alla Tp con entrambi i metodi. Dei 76 ceppi di *E. faecalis*, tutti sensibili con Vitek a Va e Tp, 2 sono risultati intermedi alla Va con E-test (MIC=6) dopo che Vitek aveva dato sensibilità anche se con valori border-line (MIC=4). Tutti sensibili i 14 ceppi di *E. faecium* con i due metodi.

Conclusioni:

- 1) Anche se il numero di ceppi testati e il periodo di osservazione sono stati limitati, si segnala che, su 91 ceppi di enterococco testati, 3 (3.3%) non sono risultati sensibili alla Va: 2 di questi (2.2%), intermedi alla Va con E-test, non sono stati rilevati da Vitek, sollecitando così una maggiore attenzione in presenza di ceppi con valori di sensibilità border-line alla Va.
- 2) La estrema eterogeneità dei materiali esaminati, delle patologie dei pazienti indagati, e dei reparti coinvolti, ci porta a ritenere che, per ora, nella nostra A.O. i VRE non siano una realtà allarmante, grazie anche ad un uso corretto e selezionato dei glicopeptidi.
- 3) È nostra prossima intenzione iniziare il monitoraggio dei pazienti delle UTI nei quali la colonizzazione intestinale da VRE sembra raggiungere valori elevati, rappresentando quindi potenziale fonte di contagio in ambito ospedaliero.
- 4) L'esistenza, in accordo con Direzione Sanitaria e CIO, di un sistema di sorveglianza degli "alert organisms" ci offre lo strumento per un rapido intervento di bonifica e per una eventuale messa a punto di nuove strategie profilattico-terapeutiche.

P043

SORVEGLIANZA ATTIVA DI LABORATORIO E DI REPARTO PER IL CONTROLLO CLINICO DELLE INFEZIONI IN CHIRURGIA

Facchini M., Colombo R., Maierna G.*, Arosio A., D'Accico M., Scarazatti E.

U.O. di Microbiologia, *Medicina Interna - Chemioterapia A.O. Istituti Clinici di Perfezionamento - Milano

In molte realtà ospedaliere, come dimostra il rapporto ISTI-SAN ¼ dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), prevale troppo spesso la sorveglianza basata sui protocolli di igiene ospedaliera o sulla attività del laboratorio di microbiologia. Non si è ancora sufficientemente diffusa la sorveglianza attiva di laboratorio associata a quella attiva di reparto (es. chirurgia) per ricercare l'epidemiologia batterica e l'antibiotico resistenza in funzione della profilassi e della terapia empirica da adottare.

I dati rilevati dall'ISS nel 2000 in Lombardia indicano: presenza di protocolli d'igiene ospedaliera: 100%; vaccinazione HBV degli operatori sanitari: 72.3%; presenza di protocolli di qualità per il controllo delle infezioni della ferita chirurgica: 33.3%; politica degli antibiotici: 23.3%; ricerca dell'antibiotico resistenza: 6%.

Dall'anno 2001 nella nostra A.O., è in atto una collaborazione operativa tra microbiologo, farmacologo- infettivologo e chirurghi che ha permesso di organizzare in alcune chirurgie (ortopedia, vascolare) una sorveglianza attiva di reparto associata a quella di laboratorio per la ricerca dell'epidemiologia batterica locale e dell' antibiotico resistenza, con lo scopo di arrivare ad un uso appropriato degli antibiotici in profilassi e terapia. Nei reparti di chirurgia si è adottato il protocollo per la gestione clinica della ferita chirurgica, che prevede tra l'altro l'invio più frequente al laboratorio dei campioni batteriologici dopo una adeguata raccolta e conservazione. Semestralmente si è proceduto ad analizzare i dati epidemiologici e le resistenze locali per valutare la profilassi antibiotica in uso e per adottare gli eventuali provvedimenti di aggiornamento.

Staphylococcus aureus (S.a.) è risultato il patogeno prevalente in chirurgia ortopedica (ChO) e vascolare (ChV). Nel 2001 l'antibiotico profilassi in ChO protesica era costituita dall'uso dei glicopeptidi mentre in ChV protesica le cefalosporine di III generazione avevano sostituito le aminopenicilline betalattamasi protette.

L'analisi epidemiologica ha evidenziato un'equivalenza di infezioni da S.a. in ChO nel 2003 (22.3%) e nel 2002 (21.9%), mentre in ChV si è riscontrato un lieve aumento nel 2003 (27.9%) rispetto al 2002 (23.3%). La sua meticillina resistenza, in funzione anche della profilassi in uso, è risultata abbastanza alta in ChO nel 2001 (30%) e più contenuta nel 2003 (23%) mentre viceversa in ChV è ulteriormente aumentata dal 2001 (47%) al 2003 (58%).

La sorveglianza attiva di laboratorio e reparto tramite lo studio dell'epidemiologia e delle resistenze ha permesso di fornire ai chirurghi una valutazione farmacologica-infettivologica aggiornata con le indicazioni per la profilassi antibiotica più idonea. Alla fine del 2003 si è consigliato in ChO protesica di mantenere la profilassi con i glicopeptidi, mentre in ChV si è posta l'indicazione a sostituire le cefalosporine di III con i glicopeptidi in mono-somministrazione perioperatoria, causa il riscontro di un'alta incidenza di stafilococchi meticillina resistenti.

Conclusioni. L'esperienza in corso conferma l'utilità della sorveglianza attiva di laboratorio e reparto tramite verifica

dell'epidemiologia e delle resistenze nei singoli reparti. Fornisce inoltre dati utili per orientare i chirurghi ad usare in modo appropriato gli antibiotici in profilassi utilizzando anche i glicopeptidi ma solo quando necessario.

P044

VALUTAZIONE DELLE ANTIBIOTICO-RESISTENZE IN CEPPI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ISOLATI NELLA ZONA DI PESCARA.

Fazii P.¹, Calella G.², Cosentino L.¹, Pelatti A.¹, Stella M.¹, Crescenzi C.¹, Pistola F.¹, Russi C.¹, Gattone M.C.¹, Morano C.¹, Riario Sforza G.¹.

¹Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, P.O. "Spirito Santo", Via Fonte Romana 8, 65124 - Pescara, ²CIO - AUSL di Pescara, Via R. Paolini 1, 65124 - Pescara.

Introduzione

Streptococcus pyogenes (Sp) è un agente patogeno frequentemente coinvolto nelle infezioni delle vie aeree superiori. E' infatti causa di faringotonsilliti, soprattutto in età pediatrica, di infezioni cutanee, di scarlattina e di patologie sistemiche come la febbre reumatica. Tuttavia la sorveglianza epidemiologica, ha individuato fin dal 1994 un incremento di ceppi batterici farmaco-resistenti, soprattutto per la classe dei macrolidi. La prima rilevazione della resistenza ai farmaci antibiotici di Sp è stata condotta dal nostro gruppo di studio nel 1998: è stato quindi deciso di procedere, negli anni successivi, al monitoraggio delle resistenze effettuando rilevazioni nel 2000 e nel 2003.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati presso il Laboratorio di Microbiologia del P.O. "Spirito Santo" di Pescara, campioni biologici provenienti da pazienti ambulatoriali e dai degenti. I tamponi faringei sono stati seminati su Columbia-Agar e incubati overnight a 37° C in aerobiosi. Per l'identificazione sono state utilizzate le colonie che presentavano beta emolisi e sensibilità alla bacitracina. L'antibiogramma è stato effettuato con la metodica Kirby-Bauer secondo le indicazioni NCCLS.

Risultati e conclusioni

La prima rilevazione del 1998 aveva evidenziato, su 112 ceppi di Sp, la totale sensibilità nei confronti dei beta lattamici, il 53% di ceppi resistenti all'eritromicina e l'8% resistente alla clindamicina. La rilevazione effettuata nell'anno 2000 ha documentato, su 204 ceppi di Sp, la completa sensibilità ai beta lattamici, il 50% di resistenza all'eritromicina e l'8% di resistenza alla clindamicina. L'ultima rilevazione, eseguita nel periodo febbraio 2003-gennaio 2004, su 184 ceppi di Sp ha documentato l'assenza di resistenze ai beta lattamici, il 45% di resistenza ai macrolidi ed il 3% alla clindamicina. I dati osservati, pur registrando una lieve diminuzione della resistenza ai macrolidi, si discostano da quelli registrati dal Progetto GISPNEUMO, che ha evidenziato a livello nazionale una minore resistenza di Sp ai macrolidi con struttura a 14 e 15 atomi di carbonio. Si sottolinea inoltre l'importanza del monitoraggio farmaco-epidemiologico nei confronti di Sp, al fine di poter fornire indicazioni per la scelta di una corretta terapia nei confronti delle infezioni sostenute da questo batterio.

P045**SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI DEI BATTERI PIÙ FREQUENTEMENTE ISOLATI NELLA REALTA' CREMONESE NEL QUINQUENNIO 1999 - 2003**

Ferrari L.

*Laboratorio di Microbiologia
Azienda Istituti Ospitalieri di Cremona*

Il continuo e spesso inadeguato uso di antibiotici impiegati nella terapia delle infezioni, ha determinato una continua riduzione della sensibilità dei batteri nei confronti dei chemioterapici.

Tale comportamento si manifesta sia in ambiente intra-, che extra-ospedaliero, determinando la necessità di utilizzare molecole sempre più "raffinate" e "costose".

Nel nostro studio è stata valutata la dinamica dei profili di sensibilità dei batteri, G+ e G-, più frequentemente isolati nel nostro territorio, nel quinquennio 1999-2003.

Materiali e Metodi

Trattandosi di un'indagine retrospettiva, i dati sono stati estratti dai database dei sistemi analitici operanti nel nostro laboratorio: Sceptor B.D. (impiegato in routine fino al dicembre 2001) e Phoenix B.D. (dal gennaio 2002 in poi), valutando l'attività di Amoxicillina/Clavulanato, Amikacina, Cefotaxime, Cefotazidime, Imipenem, Ciprofloxacina, Cootrimoxazolo Vs. E.coli, K.pneumoniae, E.cloacae, S.marcescens, Ps.aeruginosa oltre che Oxacillina, Vancomicina Vs S.aureus, S.epidermidis ed E.faecalis.

La ricerca ha interessato i ceppi batterici isolati dai pazienti degenti nel nostro ospedale (65% circa) e ceppi isolati da pazienti esterni (35% circa), afferenti ai nostri ambulatori, per un volume di 10.000 - 12.000 ceppi/anno, dal gennaio 1999 al dicembre 2003.

Risultati

L'analisi dei dati ottenuti evidenzia una modesta riduzione delle sensibilità degli isolati agli antibiotici, che si attesta, nell'ultimo triennio, su valori abbastanza costanti, concordi con i dati riportati in letteratura. Da segnalare una progressiva diminuzione della meticillina resistenza per St.aureus, in ambito ospedaliero, spiegata dall'azione di controllo e di intervento di un'attiva Commissione Infezioni Ospedaliere. Per quanto riguarda i ceppi batterici extra-ospedalieri, è presente, rispetto al campione precedente, una maggiore attività di numerose delle molecole considerate, solo per alcune di queste (Fluorochinoloni), si assiste ad una riduzione della loro attività Vs alcune specie batteriche, probabilmente per il largo impiego di tali molecole nella terapia empirica, ambulatoriale, delle infezioni genito-urinarie.

Conclusioni

L'evidente pressione selettiva indotta dall'impiego massivo di antibiotici sta evidenziando nel nostro territorio, fino a qualche anno fa, miracolosamente indenne, nuovi ed insidiosi fenomeni di resistenza costantemente in aumento, quali l'insorgenza di ESBL in numerosi G- e la comparsa, sempre più frequente, di VRE, Pneumococchi Penicillino-Resistenti e Stafilococchi coagulasi-negativi Meticillino-Resistenti.

P046**CLONALITÀ DI STAFILOCOCCI OXACILLINO RESISTENTI ISOLATI DAL NASO DI PAZIENTI E PERSONALE IN 4 RIANIMAZIONI ROMANE (SEERBIO)**

Fontana C.1a, Favaro M.1a, Carletti M.2a, Carducci G.2a, Salzano M.2b, Iodice F.2b, Silvestri A.4a, Iandimarino F.4b, Gallo M.T.3a, Pelagalli L.3b, Natoli S.1b, Testore G.P.1c

*1a Università "Tor Vergata": 1a Dip. Medicina Sper. e Sc. Bioch., 1b Terapia Intensiva, 1c M.Infettive**2 OPBG-IRCCS: a Microbiologia, b Terapia Intensiva**3IRCCS-IFO: a Microbiologia, b Terapia Intensiva**4G.B.Grassi: a Microbiologia, b Terapia Intensiva***Introduzione e Scopo del lavoro:**

Le infezioni ospedaliere (IO) coinvolgono il 5-10% dei pazienti ospedalizzati con enormi costi umani e finanziari. La prevenzione delle IO è un obiettivo primario dei Piani Sanitari Nazionali sin dal 1998. Gli stafilococchi aurei e non aurei sono i più frequenti agenti delle IO, in particolare nelle terapie intensive (TI) in cui l'oxacillino-resistenza (Sta-Oxa-Res) raggiunge il 70% degli isolati. I portatori nasali di stafilococchi oxa-resistenti hanno un rischio di sviluppare un'infezione nel corso del ricovero aumentato da 2 a 10 volte. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la prevalenza di Sta-Oxa-Res in quattro unità di TI partecipanti al gruppo di lavoro sulle Eziologie E sulle Resistenze Batteriche nelle Infezioni Ospedaliere (SEERBIO).

Materiali e metodi:

Tamponi nasali sono stati prelevati da pazienti e personale due volte a distanza di 30 gg. Tutti gli Sta-Oxa-Res dopo opportuno screening su terreni selettivi (CNA, Bio Merieux e Oxacillin Screen Agar, BD) sono stati sottoposti a conferma della Meticillino-Resistenza secondo quanto previsto dall'N.C.C.L.S. E' stata valutata la correlazione genetica tra gli isolati mediante l'utilizzo della f-AFLP e successiva elaborazione di matrici di similarità degli indici dei Dice, nonché elaborazione grafica in dendrogrammi mediante UPGMA.

Risultati e conclusioni:

Il 17% degli stafilococchi è risultato portatore del gene mecA (83% isolato da personale della TI e 17% da pazienti). La f-AFLP ha evidenziato correlazione e/o clonalità genetica nel 60% degli isolati tra personale e pazienti, ciò a conferma dell'ipotesi di un trasferimento di germi dal personale sanitario verso il paziente e viceversa.

P047**UTILIZZO DELLA FLUORESCENT-AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (F-AFLP) NELL'ACCERTAMENTO DELLE INFEZIONI NOSOCOMIALI**Fontana C.^{1,2}, Favaro M.¹, Pistoia E.S.¹, Minelli S.², Altieri A.², Favalli C.^{1,2}.*¹Dipart. Medicina Sper e Sc. Bioch - Università Tor Vergata - Via Montepellieri 1 00133 Roma**²Policlinico Tor Vergata - V.le Oxford 81- 00133 Roma.*

Il controllo delle infezioni nosocomiali rappresenta una problematica di estrema attualità e particolarmente sentita nelle grandi aziende ospedaliere che hanno compreso come l'at-

tuazione di procedure atte alla prevenzione ed al controllo delle infezioni rappresenti un traguardo da raggiungere. Ciò sia per il miglioramento del management del paziente (un decorso ospedaliero senza infezioni migliora la percezione della qualità del servizio offerto al paziente) sia nell'ottica di un contenimento dei costi di una azienda, si stima che un'infezione che intercorre durante una degenza ospedaliera incide per un costo variabile compreso fra i 5000-30.000 euro. Nella gran parte dei casi le aziende si sono date di avanzati sistemi hardware e software per il controllo delle infezioni ospedaliere, ma ciò che risulta di vitale importanza ai fini del contenimento dell'infezione, affinché questa non si trasformi in una epidemia nosocomiale, è di poter disporre di avanzati sistemi di studio della correlazione genetica degli isolati oggetto dell'infezione.

La letteratura ne fornisce diversi esempi come PFGE, la ribotipizzazione, MLE ecc, ma non tutti sono di facile applicabilità e di facile interpretazione. Soprattutto, allo stato attuale non tutte le procedure si sono dimostrate applicabili indifferentemente all'intero universo dei microrganismi che possono essere causa d'infezione.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la possibile applicazione di una metodica relativamente giovane come la f-AFLP nell'accertamento genetico delle infezioni nosocomiali.

La metodica si è dimostrata estremamente versatile ed applicabile sia ai Gram-positivi che ai Gram-negativi con piccole modifiche procedurali. E' di facile interpretazione anche se abbisogna allo stato attuale di una maggiore sviluppo di software che aiutino nella rapida elaborazione grafica dei risultati ottenuti. Consente grazie al notevole supporto tecnologico di cui è fornita di fornire risultati in un tempo massimo di 24 ore. Quest'ultimo aspetto rappresenta uno dei maggiori vantaggi applicativi se si tiene conto di come il tempo giochi un ruolo fondamentale nel contenimento delle infezioni.

P048

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI SALMONELLA, YERSINIA E CAMPYLOBACTER

Franzin L., Cabodi D., Bonfrate N.

Ospedale Amedeo di Savoia - Torino

Obiettivo. La genotipizzazione dei ceppi batterici è utile negli studi epidemiologici. Scopo del lavoro è la tipizzazione molecolare di ceppi di *Salmonella*, *Yersinia* e *Campylobacter* isolati da pazienti HIV+.

Metodi. Sono stati esaminati 68 soggetti HIV+ (35 AIDS; media CD₄: 197 cellule x 10⁶/L, range: 3-755) con sintomatologia gastroenterica. Sono stati isolati: *Salmonella* nel 7,3% dei pazienti, *Yersinia* nel 10,3% e *Campylobacter* nel 7,3%. I ceppi sono stati tipizzati con RAPD-PCR; l'amplificato è stato sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio al 2% e su gel di poliacrilamide. Sono stati studiati 10 ceppi *Salmonella*, 13 *Yersinia* (8 *Y. enterocolitica* 1A, 1 *Y. intermedia* e 4 *Y. frederiksenii*) e 19 *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp *jejuni* biotipo I e II di Lior, *C. lari* e *C. spp*). La ricerca dei plasmidi è stata eseguita con metodo Portnoy e con metodo Birboim e Doly.

Risultati. Gli isolati di *Salmonella* mostravano profili elettroforetici identici in due soggetti. I ceppi presentavano almeno un plasmide di ~100 MDal; in un paziente è stata anche osservata la presenza di ceppi con plasmidi di 70 e 1,5 MDal e in un altro di 1,2 MDal. I profili RAPD-PCR di *Yersinia* appartenenti allo stesso paziente sono risultati identici, tranne per *Y. enterocolitica* 1A con plasmidi di 3,9 MDal

e di 2, 9, 51, 70 MDal. I tracciati elettroforetici RAPD-PCR di *Y. frederiksenii* sono risultati simili. I ceppi di *Campylobacter* hanno presentato profili identici nello stesso paziente e diversi rispetto a quelli degli altri. *C. lari* presentava plasmide di ~20 MDal. I ceppi *C. jejuni*, isolati da 3 campioni successivi di un paziente sono risultati identici.

Conclusione. La tipizzazione dei ceppi con i metodi molecolari ha permesso di evidenziare un comune profilo elettroforetico per isolati diversi, consentendo di ottenere utili informazioni sulla circolazione e sulla modalità di diffusione degli stipiti studiati.

P049

PSEUDOMONAS AERUGINOSA: PREVALENZA 1999-2003 NELLE TERAPIE INTENSIVE DI QUATTRO OSPEDALI ROMANI (SEERBIO)

¹Gallo M.T. ²Carletti M., ³Fontana C., ⁴Meledandri M., ⁵Testore G.P.

¹I.F.O. San Gallicano IRCCS

²OBPG-IRCCS Lab. Analisi Palidoro

³Uni. Tor Vergata-Microbiologia

⁴ACO S.F.Neri UOC Microbiologia

Introduzione e scopo del lavoro:

Pseudomonas aeruginosa è responsabile di numerose infezioni principalmente in pazienti immunocompromessi. Questo patogeno è naturalmente resistente a molti antibiotici ed ha una grande capacità di acquisire nuovi meccanismi di resistenza. Per questo motivo è richiesta una analisi continua della sensibilità agli antibiotici. Scopo del lavoro è stato quello di valutare la sensibilità di antimicrobici su ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* isolati da campioni clinici provenienti dalle Terapie Intensive di quattro ospedali romani nel periodo 1999-2003.

Materiali e metodi:

Le identificazioni e gli antibiogrammi sono stati eseguiti mediante sistemi automatici (Vitek, Bio-Merieux e Phoenix, BD) e riuniti in un unico database. Tutti i campioni sono stati saggiati con varie classi di antibiotici: chinoloni, aminoglicosidi, carbapenemi, penicilline e cefalosporine per un totale di 12 antibiotici.

Risultati:

Lo *Pseudomonas* ha mostrato una elevata resistenza nei confronti del Ceftriaxone (95,26%), dell'Imipenem (49,19%) e del Meropenem (41%); una attività sovrapponibile tra Levofloxacin (42%) e Ciprofloxacina (40%). L'antibiotico con la più alta attività in vitro rilevata nell'anno 2003 è la piperacillina (73%).

Conclusioni Sembra probabile che la maggior parte di questa multiresistenza rifletta l'accumulo di mutazioni multiple, anche se questo deve essere confermato da studi di genetica molecolare.

La selezione di mutanti resistenti è associata alla terapia antibiotica utilizzata per lo *Pseudomonas*, al dosaggio ed al sito di infezione. E' quindi importante valutare la sensibilità del microrganismo isolato per ridurre l'uso inappropriato di antibiotici.

BIBLIOGRAFIA

1. Cobo Martinez F., Bermudez Ruiz P., Manchado Manas P.: Situación actual de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. Rev.Esp. Quimoterap. Dic.2003; vol.16 (n.4):450-452

P050

MODELLO ANIMALE DI SINDROME DI GUILLAIN-BARRE' DA IMMUNIZZAZIONE CON LIPOPOLISACCARIDE DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

Gandolfi P.,* Luciani M.,* Caporale C.M.,** Armillotta G.,* Uncini A.**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo *

Centro Malattie Neuromuscolari. Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Università "G. d'Annunzio", Chieti **

La sindrome di Guillain-Barré (GBS) è una neuropatia dis-immune post-infettiva. La gastroenterite da *Campylobacter jejuni* (*Cj*) è l'antecedente infettivo più comune nella variante assonale di GBS. I pazienti affetti da GBS assonale hanno frequentemente anticorpi contro gangliosidi (GM1, GD1a) espressi nel nervo periferico umano. Alcuni sierotipi di *Campylobacter jejuni* sintetizzano acido sialico e contengono epitopi gangliosidici nel lipopolisaccaride (LPS). È stato ipotizzato che gli anticorpi antiganglioside indotti dall'infezione da *Cj* aggredirebbero i gangliosidi del nervo provocando la GBS. Abbiamo recentemente sviluppato nel coniglio un modello di GBS con elevati titoli di anticorpi antiganglioside tramite immunizzazione con lipopolisaccaride estratto da *Cj* e keyhole limpet hemocyanin (KLH). Il modello animale ripercorre il percorso patogenetico ipotizzato nella GBS post-infettiva umana e la KLH, una glicoproteina che stimola in maniera non specifica l'immunità umorale e cellulare, svolge un ruolo cruciale nell'induzione della malattia.

Abbiamo immunizzato undici conigli con LPS, estratto da un ceppo di *Campylobacter jejuni* HS:19, e adiuvante di Freund (CFA) (I gruppo); in un secondo esperimento abbiamo immunizzato sette conigli con LPS, CFA e KLH

(II gruppo). Tutti i conigli del primo e del secondo gruppo hanno dato luogo ad un'importante risposta umorale nei confronti del LPS. Nel gruppo I le IgG hanno raggiunto un titolo di 25600 e di 6400 nel gruppo II. Anticorpi IgM anti-GM1 sono stati trovati a basso titolo due settimane dopo la prima immunizzazione in entrambi i gruppi e in seguito sono aumentati fino a 3200 nel primo gruppo e a 6400 nel secondo. Le IgG anti-GM1 allo stesso modo sono aumentate fino a 51200 nel gruppo I e a 25600 nel gruppo II. Attraverso la caratterizzazione del LPS mediante Western Immunoblotting si è visto che il siero dei conigli immunizzati reagisce fortemente con una banda di migrazione di 6.5 kDa così come con la stessa banda reagiscono la tossina colerica (CT), la peanut arabic agglutinin (PNA) e il siero del paziente con anticorpi anti-GM1. Allo stesso modo abbiamo dimostrato in Western Immunoblotting il legame tra il LPS e gli anticorpi monoclonali anti-GM1, GD1a e GD1b. La cinetica di IgM e IgG anti-GD1b si è mostrata simile a quella degli anticorpi anti-GM1 ma i titoli sono stati più bassi: le IgG sono aumentate fino a 3200 nel primo gruppo e fino a 12800 nel secondo. Le IgM anti-GD1a sono rimaste a basso titolo in entrambi i gruppi dall'inizio alla fine dell'esperimento mentre le IgG anti-GD1a sono aumentate fino a 3200 nel primo gruppo e a 800 nel secondo. Non abbiamo trovato invece in nessuno dei due gruppi IgM e IgG anti-GD1b.

Questo è stato il primo modello animale che riproduce il processo patogenetico ipotizzato in GBS di tipo assonale con produzione di anticorpi antiganglioside in seguito ad un'infezione da *C. jejuni*; si è visto che il LPS di *Cj* è un potente stimolatore capace di indurre nel coniglio un'importante

risposta antiganglioside. Inoltre si è anche visto che, per indurre la neuropatia, è di importanza cruciale l'impiego di KLH, una glicoproteina conosciuta come stimolatrice di risposta sia umorale che cellulare.

P051

TREND DELLA SENSIBILITÀ DI BATTERI NON FERMENTANTI ISOLATI DALL'ESPETTORATO DI PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA (2001-2003)

Garlaschi M.L.*, Cariani L.*, Scarazatti M.[^], Clarizia G.*, Russo P.*, Laricchia L.*, Costantini D.**.

* U.O. di Microbiologia, Ist. Clin. di Perfezion., Milano

**Dip. di Pediatria, Centro di Riferimento Regionale

Fibrosi Cistica, Cl. Ped "De Marchi", Univ. Milano

[^] Dip. di Pediatria, Cl. Ped "De Marchi", Univ. Milano

Introduzione. I microrganismi che colonizzano le basse vie aeree di pazienti con Fibrosi Cistica nei primi anni di vita, sono *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Nell'età prepubere si instaura *Staphylococcus aureus* e poi, nell'età adolescenziale si instaurano i batteri Gram negativi non fermentanti, fra questi *Pseudomonas aeruginosa* (PA), che segna un netto declino della funzionalità respiratoria, *Burkholderia cepacia* complex (BC), che spesso determina una prognosi sfavorevole, *Achromobacter xylosoxidans* (AC) e *Stenotrophomonas maltophilia* (SM) di non ancora chiaro ruolo patogeno.

Materiali e metodi. Sono stati valutati 650 pazienti con Fibrosi Cistica afferenti al Centro di Riferimento Regionale Lombardo. Per ogni paziente è stato eseguito l'esame culturale dell'espettorato almeno due volte in un anno, per un totale di 7959 campioni, di cui 1440 (82%) è risultato positivo per uno o più microrganismi.

I batteri non fermentanti valutati nei tre anni sono stati 12.738.

Risultati. Nella tabella sottostante sono messe a confronto le % di sensibilità, dei batteri Gram negativi non fermentanti sopra riportati, negli anni 2001-2003 verso gli antibiotici più utilizzati e più significativi:

	PA		BC		AX		SM	
	'01	'03	'01	'03	'01	'03	'01	'03
Amikacina	55	52	0	0	4	6	Nv*	Nv
Ceftazidime	65	60	3	8	40	40	Nv	Nv
Ciprofloxac.	54	57	8	1	5	4	Nv	Nv
Levofloxac.	54	57	15	5	31	32	Nv	Nv
Meropenem	80	76	37	40	57	67	Nv	Nv
Pip/Tazob.	61	81	15	9	66	53	Nv	Nv
Tobramicina	65	64	0	0	3	2	Nv	Nv
Trim./Sulfa	0	0	36	28	58	75	93	95

* Nv= non valutato

Conclusioni.

Nessuno dei microrganismi considerati, ha mostrato un incremento di resistenza verso gli antibiotici valutati, negli anni 2001, 2003.

Bibliografia.

1. Cystic Fibrosis Foundation. 2002. Patient registry 2001 annual report. Cystic Fibrosis Foundation, Washington, D.C.

P052

DETERMINAZIONE DEL LIVELLO SIERICO DI ANTICORPI ANTIPSEUDOMONAS AERUGINOSA IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Garlaschi M.L.*, Cariani L.*, Scarazatti M.[^], Clarizia G.*, Russo P.*, Laricchia L.*, Costantini D.**.

* U.O. di Microbiologia, Ist. Clin. di Perfezion., Milano

**Dip. di Pediatria, Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica, Cl. Ped "De Marchi", Univ. Milano

[^] Dip. di Pediatria, Cl. Ped "De Marchi", Univ. Milano

Introduzione. L'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* nei pazienti con Fibrosi Cistica provoca un notevole declino della funzionalità respiratoria. La maggior parte degli AA indica che una precoce terapia antibiotica può prevenire l'instaurarsi di un'infezione cronica da *P. aeruginosa*.

Scopo. Scopo del nostro studio è verificare se la ricerca degli anticorpi antipseudomonas aeruginosa può contribuire a definire diagnosi di infezione da *P. aeruginosa*, più precocemente dell'esame culturale dell'espettorato.

Materiali e Metodi. Sono stati valutati 120 pazienti con Fibrosi Cistica (81 senza infezione da *P. aeruginosa*, 30 con infezione da *P. aeruginosa* e 30 che hanno sviluppato, dopo il dosaggio degli anticorpi, colonizzazione o infezione da *P. aeruginosa*).

La ricerca degli anticorpi anti, *P. aeruginosa* è stata eseguita mediante un test rapido e quantitativo in Elisa che mette in evidenza anticorpi sierici della classe IgG e della classe IgA rivolti contro il lipopolisaccaride (LPS) di *P. aeruginosa*. Il cut off del metodo è di 8U/ml per le IgG e di 10U/ml per le IgA (*Pseudomonas aeruginosa* IgG/IgA Elisa Kit-Genesis Diagnostics, distribuito in Italia da Arnika srl)

Risultati. Nella tabella sottostante sono riportati i valori medi ottenuti per le seguenti categorie:

I categoria: pazienti senza infezione da *P. aeruginosa*

II categoria: pazienti che hanno sviluppato, dopo il dosaggio degli anticorpi, colonizzazione o infezione da *P. aeruginosa*, con 1 o più isolamenti.

III categoria: pazienti con infezione da *P. aeruginosa*

	IgG U/ml	IgA U/ml	% Pz Negativi	% Pz Positivi
I categoria	4,86	6,43	60,5	39,5
II categoria	5,57	7,33		
	(1 isol)	(1 isol)	50,0	50,0
	6,23	10,325		
	(>2 isol)	(>2 isol)		
III categoria	9,68	28,8	11,1	88,9

Discussione e Conclusioni. I nostri risultati suggeriscono che gli anticorpi anti *P. aeruginosa* della classe IgA hanno una buona concordanza con l'esame culturale dell'espettorato e sembrano essere prognostici della colonizzazione da *P. aeruginosa*, mentre gli anticorpi della classe IgG sembrano essere un marker meno sensibile della colonizzazione da *P. aeruginosa*.

BIBLIOGRAFIA.

1. West SEH, Zeng L, Lee BL. Respiratory Infection whit *Pseudomonas aeruginosa* in children whit cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. JAMA. 287(22): 2958-2967, June 12,2002

P053

CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN UNA POPOLAZIONE AFFETTA DA PROSTATITE CRONICA: RUOLO EZIOPATOGENETICO

Garlaschi M.C.*, Bonamore R.*, Cariani L.*, Calmi S.*, Gritti S.*, Follesa A.*, Magri V.[^], Trinchieri A.^{^^}, Scarazatti E.*

*U.O. di Microbiologia, Ist. Cl. di Perfezionamento, Milano

[^]U.O. di Urologia, Amb. territoriale di urologia ed ecografia urologia, Ist. Cl. di Perfezionamento, Milano

^{^^}U.O. di Urologia, Azienda Ospedaliera Alessandro Manzoni, Lecco

Scopo. Scopo del nostro lavoro è stato quello di evidenziare il ruolo eziopatogenetico di *Chlamydia trachomatis* (CT) in una popolazione maschile affetta da prostatite cronica (PC).

Materiali e Metodi. Nel periodo compreso fra il 14/05/20001 e il 29/11/2003, sono stati studiati 414 pazienti di età compresa fra 21 e 78 anni, pervenuti al Servizio di Urologia ed Ecografia Urologica della nostra Azienda, con diagnosi clinico-ecografica di prostatite cronica. Tutti i pazienti sono stati sottoposti al prelievo di materiale uretrale tramite tampone (TU), alla raccolta dei materiali per il Test di Stamey e Meares: urine da primo mitto (VB1), urine da mitto intermedio (VB2), urine dopo massaggio prostatico (VB3), secreto prostatico (EPS) e, in alcuni casi, in funzione del dato clinico-ecografico, sulla base dei sintomi eiaculatori e/o di segni ecografici di flogosi delle vie seminali, ad una raccolta del Liquido Seminale (LS). I campioni sono stati inviati subito al laboratorio e conservati secondo quanto descritto nella metodica utilizzata. Dopo l'estrazione del DNA batterico, è stata avviata una amplificazione degli acidi nucleici. Sono state utilizzate due metodiche diverse a seconda del periodo di ricerca: metodo di Nested PCR (ARNIKA/ABANALITICA) e metodo di LCR (ABBOTT). **Risultati.** Sono stati isolati batteri in 112 casi dei 414 pazienti affetti da prostatite cronica (27%). *Chlamydia trachomatis* è stata rinvenuta in 8 casi; in 7 di questi 8 pazienti è stata ritrovata come unico microrganismo. I risultati ottenuti sono riportati in tabella:

N°	ETÀ	EPS	VB3	LS	TU/VB1
55/02	28	CT/PCR			CT/PCR
96/02	72	CT/PCR			CT/PCR
99/02	51			CT/PCR	
100/02	52		CT/PCR	CT/PCR	
235/02	30			CT/PCR	
32/03	64		CT/PCR		
56/03	35	CT/PCR			CT/PCR
84/03	27		CT/PCR	CT/PCR	CT/PCR

Conclusioni. L'analisi dei dati conferma il ruolo patogeno di *Chlamydia trachomatis*, e l'importanza di utilizzare metodiche di biologia molecolare per la ricerca di tale microrganismo, soprattutto in quei materiali biologici che per le loro caratteristiche intrinseche la impongono come unica metodologia.

P054**ANTIBIOTICO RESISTENZA DI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA:
DATI RACCOLTI NELL'ANNO 2003**

Genco R., Giannobile G., Puccio G., Turchio B., Verro M.,
Graci L., La Chiusa S.

U.O.C. Patologia Clinica ,
Ospedale Buccheri La Ferla FBF
Palermo

Premessa:

Tra i batteri non fermentanti *P. aeruginosa* è la specie più diffusa e quella che riveste la maggior importanza soprattutto come patogeno nosocomiale. La ridotta sensibilità di tale microrganismo a numerosi antibiotici è dovuta, sia ad una intrinseca resistenza, sia ad una straordinaria capacità di selezionare ceppi multiresistenti, tali fenomeni sono legati a complessi meccanismi che coinvolgono la produzione di enzimi inattivanti (beta-lattamasi ed enzimi inattivanti gli aminoglicosidi), una scarsa permeabilità della membrana esterna e la presenza di efficaci sistemi di efflusso attivo; esistono sensibili differenze a livello geografico dei pattern di resistenza, l'obiettivo dello studio è quindi la valutazione dello spettro di resistenza dei ceppi isolati presso il nostro laboratorio nel 2003.

Metodi e materiali:

Tecniche colturali: utilizzo di cetrinide agar (Biomérieux), incubazione 18-24 ore.

Identificazione: tipico aspetto delle colonie, positività della ossidasi, morfologia (bacilli gram negativi) e all'indolo negatività. Antibiotogramma col metodo di microdiluzione in brodo ai break-point NCCLS 2002 (Vitek 2).

Risultati:

Abbiamo isolato 168 ceppi provenienti per il 26% dai reparti di rianimazione e per il 31% da Medicina. Per quanto riguarda il materiale di isolamento il 19% dei ceppi di *P. aeruginosa* è stato isolato da urine, il 19% da broncoaspirato e BAL, il 25% da espettorato, il 4.5% da liquido biliare, il 4.5% da liquidi di drenaggio, l'11% da tamponi cutanei, il 3.6% da emocoltura ed infine il 12% da materiali vari.

L'attività dei vari antibiotici saggiati è il seguente:

Antibiotici di gruppo A:

Ceftazidime: ceppi sensibili 57%, resistenti il 27%.

Gentamicina: sensibili 60%, resistenti il 35%.

Piperacillina: ceppi sensibili il 64%, resistenti il 35%.

Antibiotici di gruppo B:

Amikacina: ceppi sensibili 75%, resistenti 12%.

Cefepime: ceppi sensibili 65%, resistenti il 21%.

Ciprofloxacina: ceppi sensibili 67%, resistenti 28%.

Imipenem: ceppi sensibili 66%, resistenti 11%.

Meropenem: ceppi sensibili 71%, resistenti il 18%.

Tobramicina: ceppi sensibili 67%, resistenti il 30%.

Trimetoprim /Sulfam.: ceppi sensibili 3% resistenti 97%.

Antibiotici di gruppo C:

Cefotaxime: ceppi sensibili 7%, resistenti 61%.

Conclusioni:

Le resistenze di *P. aeruginosa* ai vari Beta-lattamici ed alle altre classi di antibiotici sono assai variabili per cui il saggio della sensibilità in vitro è indispensabile per istituire una terapia mirata ed assicurare una risposta terapeutica efficace.

P055**EPIDEMIOLOGIA DELLE BATTERIEMIE :
DATI RILEVATI NEL QUADRIENNIO 2000-2003
PRESSO L'OSPEDALE BUCCHERI LA FERLA
BBF DI PALERMO**

Giannobile G., Genco R., Puccio G., Turchio B., Verro M.,
Graci L., La Chiusa S.

U.O.C. Patologia Clinica ,
Ospedale Buccheri La Ferla FBF
Palermo

Premessa

La presenza, già da parecchi anni, nel nostro ospedale di un sistema informatizzato ci ha permesso uno stretto monitoraggio eziologico delle batteriemie ed una altrettanto efficace e tempestiva comunicazione ai vari reparti delle informazioni epidemiologiche raccolte, tutto ciò nell'ambito di una serie di iniziative promosse da un attivo C.I.O. (Comitato Infezioni Ospedaliere).

Metodi e materiali:

I dati riportati si riferiscono al quadriennio 2000-2003, sono stati presi in considerazione i set di emocoltura provenienti dai vari reparti dell'ospedale (Medicina, Pneumologia, Rianimazioni, Chirurgie, Pediatria ecc) per un totale di 7159 campioni. I relativi flaconi Bactec per aerobi, anaerobi e miceti sono stati incubati rispettivamente per 7 e 14 giorni nel sistema automatico per emocolture Bactec 9240 (Becton Dickinson Microbiology).

I flaconi segnalati positivi sono stati subcolturali in agar sangue montone, agar MacConkey, agar Sabouraud (24 ore in aerobiosi), agar cioccolato, (24-48 ore in microaerofilia) ed Agar Schaefer (24 ore in anaerobiosi (Biomérieux)). L'identificazione degli isolati è stata effettuata utilizzando il sistema Vitek 2, affiancato dalle gallerie del sistema API (Biomérieux).

Risultati:

Sono risultate positive 766 emocolture pari al 10.7% del totale dei campioni analizzati. Sono stati isolati 6 ceppi di batteri anaerobi (0.78%), 38 ceppi di lieviti (4.96% del totale) con una netta preponderanza di *C. albicans*. I gram negativi non fermentanti costituiscono l'8.09% del totale (62 ceppi) con una netta prevalenza di isolamento di *Acinetobacter* spp e di *Pseudomonas* spp, gli Enterobatteri rappresentano il 17.10% del totale con l'*E. coli* nettamente preponderante (84 ceppi), gli Stafilococchi risultano però i microrganismi più frequentemente isolati (418 ceppi il 54.56%) tra di essi il più rappresentato è lo *S. epidermidis* (184 ceppi) seguito dallo *S. aureo* (62 ceppi). Tra gli streptococchi, gli enterococchi rappresentano il 7.05% del totale (54 ceppi) lo *S. agalactiae* il 2.35% (18 ceppi) lo *S. pneumoniae* l'1.44% (11 ceppi). Abbiamo isolato infine 11 ceppi di *Brucella* spp (1.44%).

Conclusioni

In linea con i dati della letteratura i microrganismi più isolati sono gli Stafilococchi coagulasi negativi, fenomeno purtroppo legato a delle modalità di prelievo dei campioni non accurato. Da sottolineare inoltre il ruolo preminente di *E. coli* e la non trascurabile presenza di Lieviti.

P056

LA PREVENZIONE DELLE INFEZIONI TRASMISSIBILI IN ENDOSCOPIA DIGESTIVA: RISULTATI DI 5 ANNI DI SORVEGLIANZA TRAMITE INDICATORI MICROBIOLOGICI

Giacomini M.* - Camporese A.** - Benedetti G.*
e GCCIO^^

*Servizio di Gastroenterologia, **S.O. di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica,

^^Gruppo di Coordinamento per il Controllo delle Infezioni Ospedaliere

Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli" - via Montereale, 24 - Pordenone

Obiettivi dello studio Per valutare il grado di affidabilità delle procedure in uso presso il Servizio di Gastroenterologia si è stabilito di procedere con un monitoraggio prolungato (gennaio 1999 - dicembre 2003) al fine di:

- evidenziare eventuali correlazioni tra le procedure di detersione, disinfezione/sterilizzazione adottate e la crescita batterica nei campioni ottenuti dal risciacquo del canale biotico degli strumenti trattati;
- realizzare, rispetto al punto precedente, un confronto tra le due tipologie di macchine impiegate.

Materiale e metodi Le apparecchiature in dotazione presentano caratteristiche differenti:

- ⇒ due macchine (A e B) utilizzano come principio attivo l'aldeide glutarica integrata da una fase di detersione;
- ⇒ la terza macchina (C) utilizza una cartuccia di acido peracetico.

Per realizzare lo studio si è proceduto a:

- standardizzare tutte le fasi del trattamento della strumentazione e della raccolta dei campioni;
- effettuare un prelievo da strumenti pre-selezionati e stoccati *over-night* (arruolamento di tutti gli strumenti nell'arco di un anno),

Risultati Nel periodo di osservazione, su 133 campioni analizzati dalle macchine A e B, 10 (pari al 7.5% del totale dei prelievi) sono risultati positivi; dai campioni esaminati sono stati isolati 10 ceppi batterici rappresentati per il 50% da gram positivi e per il 50% da gram negativi così distribuiti: *Acinetobacter calcoaceticus* (3 campioni), *Bacilli gram negativi* non identificati (1 campione), *Moraxella spp.* (1 campione), *Stafilococchi coagulanti negativi* (3 campioni), *Streptococcus spp.* (2 campioni). Per quanto riguarda, invece, la macchina C sono stati analizzati 75 campioni, 14 dei quali sono risultati positivi (18%), con una prevalenza di isolamenti di gram negativi (57%) rispetto ai gram positivi (43%), così distribuiti: *Stafilococchi coagulanti negativi* (4), *Bacillus spp.* (2 campioni), *Escherichia coli* (2 campioni), *Enterobacter cloacae* (3 campioni), *Acinetobacter calcoaceticus* (1 campione) *Stenotrophomonas maltophilia* (1 campione), *Pasteurella spp.* (1 campione).

Commento Da una valutazione preliminare si sono potuti individuare due problemi:

- ⇒ nel corso del 1999 si è verificata una contaminazione (4 campioni di *Acinetobacter calcoaceticus*) degli strumenti processati da tutte e tre le macchine. Ciò è stato imputato alla mancata disinfezione della bacinella impiegata per le prove di integrità delle guaine eseguite a fine giornata dopo il ciclo di disinfezione/sterilizzazione;
- ⇒ nel corso del 1999/2000, a causa di un ridotto numero di colonscopi in dotazione, vi è stato un utilizzo "spinto" della macchina C per il trattamento degli stessi. I con-

trolli hanno dimostrato la presenza di batteri di sicura provenienza colica (4 campioni positivi con 5 ceppi isolati). Si sono dovute modificare alcune fasi di pre-trattamento della strumentazione con cambio frequente degli spazzolini e della soluzione proteolitica;

⇒ la rimanente parte di campionatura positiva si ritiene imputabile a:

- contaminazione degli strumenti durante la loro manipolazione senza l'impiego di barriere di protezione durante la rimozione dalla macchina;
- contaminazione durante le procedure di prelievo dei campioni;

Si può comunque affermare che la tipologia della flora batterica isolata (in prevalenza *Stafilococchi*, *Streptococchi* e *bacilli gram positivi e negativi ambientali*) risulti, per qualità e per quantità, influente sotto il profilo clinico.

Il rischio che il paziente possa contrarre un'infezione durante le procedure endoscopiche risulta pertanto molto basso.

Conclusioni La differenza iniziale tra le due macchine considerate è da imputare ad elementi strutturali delle stesse (presenza di un ciclo di detersione nelle lavastumenti A e B). In seguito non si sono rilevate differenze statisticamente significative tra le apparecchiature utilizzate. Emerge però la necessità di trovare e mantenere nel tempo una standardizzazione dei processi di trattamento della strumentazione. Solo il trattamento razionale a "due stadi" permette di raggiungere gli scopi proposti: prima una pulizia accurata, dopo una disinfezione od una sterilizzazione efficace. Il controllo biologico è, allo stato attuale, da ritenersi un metodo sperimentale da impiegare soprattutto nelle fasi di messa a punto delle procedure.

BIBLIOGRAFIA

- M.A.Munoz et Al: Clinical Evaluation of Four Commercial Automatic Endoscope Disinfectors - Gastrointestinal Endoscopy 1999, vol. 49, n° 4 - part 2 ;
- Rey J.F. "La disinfezione degli strumenti endoscopici: un problema universale" Journal of Clinical Gastroenterology, 1999, n°4 giugno pag. 5
- Annual of International Medicine 1993, 118:117-128;
- V.J. Fraser: A prospective Randomized Trial Comparing Manual and Automated endoscope Disinfection Methods., I. C. Hosp. Epid., 1993 14:383-389;
- G.Angolini et Al: La detergenza come premessa indispensabile della disinfezione-sterilizzazione in endoscopia - View & Review, 1998 pag 20;
- Alvarado CJ, Reichelderfer M. APIC guideline for infection prevention and control in flexible endoscopy - Am J Infect Control 2000; 28:138-155
- M. Giacomini et Al: Utilizzo di verifiche microbiologiche come indicatore qualitativo delle procedure di disinfezione della strumentazione endoscopica - Riv. Scenario, 1995, 2:38-39
- M. Giacomini et Al.: Quali indicatori di efficacia nell'alta disinfezione: l'esperienza di un servizio di endoscopia digestiva - Riv. Scenario 2001, 3:12-15
- M. Giacomini: Indicatori biologici nella sorveglianza dei processi di alta disinfezione in endoscopia digestiva: l'esperienza di Pordenone - View & Review 2001, 11:29-32

P057

LA PREVENZIONE DELLE INFEZIONI TRASMISSIBILI IN ENDOSCOPIA DIGESTIVA: VALUTAZIONE DI UN'ALTERNATIVA ALLA GLUTARALDEIDE E ALL'ACIDO PERACETICO

Giacomini M.* - Ragazzo L.* - Stival L.* - Cattaruzzi L.* - Sanquerin N.* - Lotti C.* - Carino I.* - Alban D.* - Corsini M.* - Camporese A.** - Benedetti G.*

* Servizio di Gastroenterologia -

** S.O. di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica

Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli" -
via Montereale, 24 - Pordenone

Introduzione L'aumento del numero e della complessità delle procedure endoscopiche parallelamente comporta un aumento del rischio infettivo ad esse correlato. Un'adeguata disinfezione della strumentazione è fondamentale per prevenire la trasmissione di infezioni da paziente a paziente e dall'ambiente al paziente⁽¹⁾. La scelta dei principi attivi e dei sistemi per garantire tale risultato è cruciale: sorprendentemente esistono pochi studi disponibili che comparano e consentono una validazione dei vari metodi di ricondizionamento della strumentazione^(2,3,4). E' importante allora, in un contesto aziendalistico richiedente efficienza nei costi, efficacia e tempi brevi nel reprocessing, dotarsi di percorsi che, garantendo ottimali standard di risultato, trasferiscano nella pratica clinica le nuove tecnologie offerte dal mercato. Le macchine lavastrumenti rappresentano un grande passo in avanti: la loro scelta però è difficile poiché non ancora normata da standard ISO⁽⁵⁾. L'acqua elettrolitica acidificata (EWA) rappresenta una soluzione apparentemente ideale: permette, infatti, di trattare strumenti in tempi brevi, a costi irrisori ed è dichiarata sicura sia per i pazienti sia per gli operatori.

Obiettivo L'EWA è usata da diverso tempo in Giappone per il reprocessing della strumentazione endoscopica termolabile⁽⁶⁾. La sua efficacia è già stata dimostrata in diversi studi^(6-7,8). Scopo di questa esperienza è di valutare l'efficacia pratica dell'EWA come principio attivo per il trattamento della strumentazione endoscopica impiegata per l'esplorazione delle vie digestive.

Materiali e metodi Lo studio è stato diviso in tre fasi:

- prelievi culturali da strumento sporco (per evidenziarne la carica microbica); a ciclo di disinfezione appena conclusa; dopo stoccaggio *overnight*.
- prelievi culturali subito dopo disinfezione e dopo stoccaggio *overnight*
- prelievi culturali solo dopo stoccaggio *overnight*.

Le procedure di prelievo dei campioni sono state eseguite secondo una prassi codificata⁽⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁾: il risciacquo del canale operativo con soluzione fisiologica è integrato da un passaggio con spazzola monouso pre-sterilizzata ad ossido d'etilene. Nella fase a) il *brushing* dei canali è stato eseguito con spazzolini e soluzioni proteolitiche pluri-usati, nelle fasi b) e c) con spazzolini ricondizionati dopo l'uso e le soluzioni frequentemente rinnovate.

La soluzione disinfettante era preparata ad inizio mattinata nell'apposita macchina lavastrumenti.

Nel corso dello studio, tra la fase a) e b), è stato inserito un sistema di trattamento dell'acqua di rete che la deionizza parzialmente, riducendone la durezza migliorando il funzionamento della lavastrumenti e la capacità di detersione dell'acqua (più l'acqua è dura, minore è il suo potere di solvente e, quindi, di rimozione dello "sporco").

Per quanto riguarda le procedure di pre-trattamento, nella prima fase è stato impiegato un detergente proteolitico, nelle successive si è reso necessario introdurre un decontaminante

a base di acido peracetico.

Dopo disinfezione, gli strumenti sono stati stoccati mantenendo le procedure in uso, senza asciugatura dei canali o passaggio con etanolo al 70%.

Oltre alla macchina lavastrumenti, sono stati considerati, nella prima e seconda fase, solo colonscopi Olympus, nella terza fase dello studio anche i gastroscopi dello stesso costruttore. I colonscopi sono sempre stati pretrattati con il decontaminante, i gastroscopi solo con una soluzione proteolitica.

Nella valutazione della tipologia di microrganismi isolati si è preferito non considerare stafilococchi e streptococchi poiché spesso derivanti da verosimile contaminazione ambientale post-disinfezione.

Risultati Dal settembre 2003 al febbraio 2004 sono stati effettuati circa 750 cicli di lavaggio della strumentazione con 153 prelievi per campionatura microbiologica, dei quali 45 eseguiti nella fase a), 38 nella fase b) e 70 nella fase c). Sono risultati contaminati:

fase a)	
strumento "sporco"	il 100% dei campioni
subito dopo il ciclo di disinfezione	il 40% dei campioni
dopo stoccaggio	il 70% dei campioni
fase b)	
subito dopo il ciclo di disinfezione	il 6% dei campioni
dopo stoccaggio	il 37% dei campioni
fase c)	
dopo stoccaggio	il 32% dei campioni

I microrganismi coltivati sono quelli tipici delle vie digestive inferiori ovvero *Escherichia Coli*, *Enterobacter spp.*, *Enterococchi* e *Klebsiella pneumoniae*. In alcuni campionamenti sono stati isolati anche *Pseudomonas aeruginosa* (4 campioni) e *Proteus mirabilis* (5 campioni).

Commento L'andamento delle percentuali dei ceppi isolati dimostra il significativo miglioramento dovuto al perfezionamento delle procedure di detersione manuale della strumentazione. Tuttavia, negli strumenti stoccati (fase c), la percentuale di positivi risulta ancora molto alta: si consideri che, con altre macchine lavastrumenti e adottando procedure di pulizia meno raffinate, la percentuale di colture positive (escludendo stafilococchi e streptococchi) è pari o inferiore al 5% (*gold standard*) di tutti gli strumenti stoccati *overnight*. Unico risultato statisticamente accettabile, che si avvicina al *gold standard*, riguarda la campionatura effettuata nella fase b) sulla strumentazione appena trattata (positivi il 6% dei campioni).

La comparazione degli isolati tra la fase b) e c) dimostra un miglioramento esponenziale del processo imputabile all'attenzione che l'équipe infermieristica ha profuso nello svolgere le manovre di detersione e pulizia iniziale. Questa rappresentava una parte critica di tutto il processo poiché maggiormente soggetta a variazioni inter- e intraindividuali.

Un altro punto critico evidenziato riguarda lo stoccaggio della strumentazione: le macchine in uso (escluso la sterilizzatrice ad acido peracetico) hanno un ciclo di asciugatura non presente nella macchina ad EWA che invece elimina grossolanamente l'acqua in eccesso. L'ambiente umido residuo predispone alla crescita dei microrganismi rilevati; per questo motivo l'utilizzo di alcool e di aria compressa potrebbero rivelarsi utili a completare l'asciugatura dei canali minimizzando il rischio di ricrescita batterica. L'inserimento dei gastroscopi nella terza fase non ha modificato i risultati del monitoraggio microbiologico.

Conclusioni L'acqua elettrolitica acida sembra rappresentare un sistema che consente di utilizzare la strumentazione trattata ottenendo un alto grado di disinfezione solo tra un paziente e l'altro. All'inizio della giornata lavorativa (o in alternativa, con altre macchine, a fine giornata) gli strumenti devono, per abbatterne la carica microbica residua, essere

riprocessati. Affinando il funzionamento e standardizzando le procedure di pulizia, la procedura testata può rappresentare un'ottima soluzione ad alcuni problemi organizzativi: infatti permette, in presenza di un parco strumenti limitato, di ottenere strumenti trattati in tempi brevi ed a costi molto contenuti.

Anche se per ora le esperienze pratiche sono limitate, la necessaria revisione critica dei vari step del pre-trattamento della strumentazione e gli studi condotti suggeriscono che l'EWA potrebbe rappresentare una alternativa efficace ai prodotti impiegati per l'alta disinfezione⁽¹²⁾. Per tali motivi la sua introduzione operativa nei centri di endoscopia digestiva deve essere comunque attentamente valutata e controllata

BIBLIOGRAFIA

1. J.R. Cronmiller et Al.: Antimicrobial efficacy of endoscopic disinfection procedures: a controlled, multifactorial investigation. *Gastrointestinal endoscopy* 1999, Vol.50. No 2; 152-157
2. Vesley D. et Al.: Significant factors in the disinfection and sterilization of flexible endoscopes. *Am J Infect. Control* 1992;20:291-300
3. Frase VJ et Al.: A prospective randomized trial comparing manual and automated endoscope disinfection methods. *Infet. Control Hosp. Epidemiol.* 1993;14:383-9
4. Urayama S. et Al.: Mycobacteria and glutaraldehyde: is high-level disinfection of endoscopes possible? *Gastronitest. Endosc.* 1996;43:451-6
5. J. Rey et Al.: Electrolysed acid water (EAW) for endoscopic disinfection: an alternative to glutaraldehyde or peracetic acid. *Endoscopy* 2003;35 (suppl II) A167
6. J.H. Lee et Al.: Efficacy of electrolyzed acid water in reprocessing flexible endoscopes: comparison with 2% alkaline glutaraldehyde. *Endoscopy* 2002;34 (Suppl II) A73
7. Y.Sakurai et Al.: Endoscope contamination from HBV and HCV positive patient and evaluation of cleaning/disinfection method using strongly acid electrolyzed water. *Digestive endoscopy* 2003;15:19-24
8. K.S. Venkitanarayanan et Al.: Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, spt. 1999. vol.65, No. 9-4276:4279
9. M. Giacomini et Al.: Utilizzo di verifiche microbiologiche come indicatore qualitativo delle procedure di disinfezione della strumentazione endoscopica - Riv. Scenario, 1995, 2:38-39
10. M. Giacomini et Al.: Quali indicatori di efficacia nell'alta disinfezione: l'esperienza di un servizio di endoscopia digestiva - Riv. Scenario 2001, 3:12-15
11. M. Giacomini: Indicatori biologici nella sorveglianza dei processi di alta disinfezione in endoscopia digestiva: l'esperienza di Pordenone - View & Review 2001; 11:29-32
12. A. Raitano et Al.: Igiene e disinfezione clinica nelle strutture ospedaliere. Ed. K" - 2003 pag. 236

P058

SENSIBILITA' A VARI ANTIBATTERICI DI SCHIZOMICETI ISOLATI DA INFANTI CON STENOSI CONGENITA DELLE VIE LACRIMALI (SCDN)

D'Amelio S.; Giardini F.; Faraldi F.; Laccisaglia A.; Pollino C.; Indovina L.

Ospedale Oftalmico di Torino "Casimiro Sperino",
Via Juvarra 19, 10123 Torino

Scopo: valutare la risposta in vitro della flora batterica patogena, isolata in pazienti della prima infanzia affetti da stenosi congenita del dotto nasolacrimale, a vari antibiotici di uso topico oftalmologico.

Materiali e metodi: una serie consecutiva di 80 bambini di età inferiore ai tre anni.

Il prelievo era effettuato con tamponcini di piccolo calibro di calcio alginato sterile che, previamente imbibiti in soluzione fisiologica sterile, venivano passati nel fornice congiuntivale inferiore avendo cura di non toccare la rima palpebrale e previa pressione digitale del sacco lacrimale.

È stata adottata la tecnica KIRBY-BAUER con dischetti per antibiogramma della BD e le risposte valutate secondo "BBL-SENSI-DISC ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST DISCS".

Per gli schizomiceti patogeni isolati dopo 24-48 h di incubazione a 37°C è stato allestito un Antibiogramma su Mueller Hinton o su Agar Cioccolato a seconda delle loro esigenze di crescita.

I ceppi isolati sono stati cimentati con il pool ufficiale di antibatterici utilizzato di routine dal nostro laboratorio per l'esecuzione degli antibiogrammi: Ampicillina, Cloramfenicolo, Tetraciclina, Neomicina, Netilmicina, Amikacina, Ciprofloxacina, Ofloxacina, Gentamicina, Acido Fusidico, Tobramicina, Norfloxacina, Lomefloxacina, Sulfametossazolo.

Risultati: sulla flora batterica isolata si possono rilevare i seguenti profili di sensibilità agli antibiotici:

Streptococcus pneumoniae: (AMP 100%, CAF 100%, TETRA 86%, CIPRO86%). *Streptococcus viridans*: (AMP 87%, CAF 90%, CIPRO 94%, OFLOX 83%). *Moraxella* gen.: (AMP 96% CAF 100% TETRA 98%, CIPRO 100% OFLOX100%, NORFOX 100%, LOMEF 98%) *Haemophilus* gen. (AMP 63% CAF 100% TETRA 91% CIPRO100%, OFLOX 88%, NORFLOX 90 LOMEF 90%). *Staphylococcus aureus* (TETRA100%, AC.FUS 100%:LOMEF 100% NET 80% CIPRO 80% OFLO 80%).

Conclusioni: dall'analisi dei nostri risultati scaturiscono delle indicazioni pratiche che aiutano il clinico verso una prescrizione farmacologica che abbia più probabilità di successo in attesa di un responso culturale e dell'antibiogramma dal laboratorio.

P059

CASO DI VAGINITE DA *ARCANOBACTERIUM HAEMOLYTICUM* IN UNA PAZIENTE IMMUNO - COMPROMESSA

Gualdi P., Rizzonelli P., Schinella M., * Provolo M.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, * U.O. Medicina territoriale, Ospedale S.Maria del Carmine, Ple S.Maria 6, 38068 Rovereto (TN)

Introduzione *Arcanobacterium haemolyticum* è un bacillo

gram positivo aerobio facoltativo, catalasi negativo e produttore di emolisi su agar sangue. Precedentemente inserito nel genere *Corynebacterium*, è stato successivamente riclassificato in un nuovo genere; mostra tuttavia alcune somiglianze con gli actinomiceti e batteri "corineformi". E' solitamente isolato da pazienti con faringiti ed infezioni cutanee, raramente causa sepsi, infezioni del sistema nervoso centrale ed endocarditi.

Caso clinico Si riferisce il caso di una donna di 55 anni che a maggio 2003, per un Ca del retto, è stata sottoposta a resezione anteriore bassa del retto, isterectomia totale, annessiectomia sinistra e metastasectomia epatica sinistra. Portatrice di ano pre-ter e di catetere vescicale fino a ottobre 2003. Inizia subito dopo l'intervento cicli di chemioterapia che continua tuttora. A novembre la paziente lamenta perdite vaginali cremose giallastre e maleodoranti con fish odor curate con metronidazolo. Scomparsa del fish odor ma permanenza della leucorrea cremosa. Vengono eseguiti pertanto esame colturale del fluor vaginale, ricerca micoplasmi urogenitali e Chlamydia. Dopo l'esito viene instaurata terapia con Bactrim che non sortisce effetto e successivamente ripetuto il tampone vaginale. Alla risposta del secondo campione viene iniziata terapia con clindamicina.

Materiali e metodi Entrambi i campioni di essudato vaginale, prelevati a distanza di 10 giorni, sono stati seminati su piastre di agar Columbia CNA incubate in anaerobiosi e su piastre con terreni selettivi per miceti, stafilococchi, Enterobacteriaceae ed enterococchi. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C sono state isolate su agar sangue piccole colonie emolitiche, catalasi negative e negative alla tipizzazione per streptococchi ?-emolitici. La colorazione di Gram ha evidenziato bacilli pleiomorfi Gram positivi e l'identificazione eseguita con gallerie Api Coryne (bioMeriueX) è stata di *Arcanobacterium haemolyticum*. L'antibiogramma eseguito su Mueller Hinton agar + sangue di montone con E-test ha dato risultati di sensibilità a cefotaxime, clindamicina, vancomicina e resistenza al trimetoprim-sulfametossazolo.

Conclusioni Sebbene *Arcanobacterium haemolyticum* venga prevalentemente isolato da pazienti con faringiti ed infezioni cutanee, nel caso da noi esposto, visto l'isolamento in più campioni in fluor vaginale, è ipotizzabile un suo ruolo come patogeno opportunisto in pazienti oncologici, come del resto già riportato in letteratura.

P060

UN SAGGIO DI "REAL-TIME PCR (TaqMan)" PER LA DIAGNOSI DI LABORATORIO DI LEPTOSPIROSI

Calderaro A., Incaprera, M., Piccolo, G., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Dettori G., Chezzi C.

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

Allo scopo di superare gli svantaggi dei metodi convenzionali di riferimento per la diagnosi di laboratorio di leptospirosi (esame colturale e saggio di microagglutinazione) è stato introdotto nel nostro laboratorio un saggio di nested-PCR che si è rivelato sensibile e specifico per *Leptospira* spp. ma non in grado di differenziare leptospire patogene da quelle saprofiti. A questo scopo, un recente saggio "Real-time PCR" per la rivelazione delle sole leptospire patogene è stato sottoposto a valutazione nel nostro laboratorio. La sua specificità è stata valutata su colture pure di leptospire saprofiti e di leptospire patogene. La sensibilità è stata valutata su cam-

pioni simulati di sangue addizionati di *L. interrogans* Australis bratislava Riccio-2. Le sospensioni di leptospire così ottenute sono state sottoposte a diluizioni seriali e analizzate mediante saggio "Real-time PCR" che prevede l'amplificazione di una sequenza interna al 16S rDNA e rivelazione della fluorescenza condotte in "ABI Prism 7000 sequence detector" (Applied Biosystem).

Nel nostro laboratorio, il saggio "Real-time PCR" è stato ottimizzato attraverso la definizione delle condizioni sperimentali (concentrazione dei "primers" e della sonda, e il numero di cicli di PCR) e ha mostrato una buona sensibilità per *L. interrogans* (CT 27,82) (Std Dev. CT 0,139). Rispetto al saggio nested-PCR, questo procedimento realizzato in un unico tubo garantisce una maggiore sicurezza contro eventuali contaminazioni, ha un tempo di esecuzione rapido (2 ore rispetto a 7-8 ore per il saggio nested-PCR), è specifico per le specie patogene e, attualmente, sufficientemente sensibile e semiautomatizzato.

P061

EPIDEMIA DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MULTIRESISTENTI, PRODUTTORI DI METALLO B-LATTAMASI IMP-13, IN UNA UNITÀ DI TERAPIA INTENSIVA DELL'IRCCS "CASA SOLLIEVO DELLA SOFFERENZA" DI SAN GIOVANNI ROTONDO (FG)

M. Labonia¹, M. Li Bergoli¹, R. Migliavacca², C. Colino³, J.-D. Docquier³, M. Spalla⁴, E. Nucleo², G. M. Rossolini³, L. Pagani²

¹Lab. di Microbiologia - IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza S. Giovanni Rotondo, (FG),

²Dipartimento di Microbiologia, Università di Pavia,

³Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena,

⁴Lab. di Microbiologia - IRCCS S. Matteo Pavia.

Scopo: In questo lavoro si descrive un epidemia dovuta a *P. aeruginosa* produttrice di una MBL di tipo IMP (IMP-13) in una UTI dell'IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo (FG).

Metodi: 27 isolati di *P. aeruginosa*, non duplicati, resistenti ai carbapenemi, furono raccolti da 27 pazienti ricoverati in una UTI dell'Ospedale di S. Giovanni Rotondo (Italia meridionale) nel periodo Ottobre 2002 – Giugno 2003. La maggior parte degli isolati (25/27) proveniva dell'apparato respiratorio inferiore. I test di sensibilità *in vitro* furono eseguiti con il metodo delle microdiluizioni, come raccomandato dal NCCLS. L'E-test e il metodo di microdiluizione in brodo (EPI test) furono usati per la rilevazione fenotipica dei produttori di MBL. Per identificare i determinanti delle MBL furono eseguiti esperimenti di PCR e di sequenziamento. Per valutare le relazioni clonali fra gli isolati clinici imipenem-resistenti, fu eseguita la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), usando l'enzima di restrizione *SpeI*.

Risultati: L'EPI test dimostrava che 6 isolati di *P. aeruginosa* resistenti ai carbapenemi producevano un'attività MBL, mentre l'E-test non identificava nessuno di questi isolati. In tutti i casi, la MBL fu identificata come IMP-13 mediante metodi molecolari. I produttori di IMP-13 erano resistenti all'imipenem (MIC>32µg/ml) e al meropenem (MIC>16µg/ml), ma alcuni conservavano la sensibilità alla piperacillina/tazobactam (3/6) e una sensibilità intermedia all'aztreonam (5/6). L'analisi con PFGE mostrava che i ceppi erano correlati clonalmente suggerendo una diffusione clonale nell'ambito del Reparto. Tutti gli isolati erano resistenti all'imipenem, MIC >16, ma non al meropenem, con MIC

che variavano da 2 a >16, e sensibili alla piperacillina e piperacillina/tazobactam. L'analisi PFGE mostrava che altri due ceppi clonalmente non correlati erano presenti nello stesso Reparto.

Conclusioni: Per quanto ci risulta, questa è la prima segnalazione di una epidemia nosocomiale causata da *P. aeruginosa* produttrice di MBL IMP-13. Circa la rilevazione fenotipica delle MBL, l'EPI test potrebbe correttamente rilevare tutti i produttori di IMP-13, mentre l'E-test falliva nella loro rivelazione.

P062

PATOGENI EMERGENTI IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA: RISULTATI DI UNO STUDIO DI SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA.

Lambiase A., Lavitola A., Raia V. (1), Del Pezzo M., Sarpi O., Sepe A. (1), Rossano F.

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Università di Napoli "Federico II"

(1) Dipartimento di Pediatria, Università di Napoli "Federico II"

L'infezione polmonare cronica rappresenta la principale causa di decesso in pazienti con Fibrosi Cistica (FC). Durante la prima decade di vita, i patogeni comunemente isolati sono *Staphylococcus aureus* ed *Haemophilus influenzae*, mentre *Pseudomonas aeruginosa* rappresenta il patogeno più frequente nell'adolescenza.

Recentemente sono stati isolati nuovi patogeni, *Stenotrophomonas maltophilia* (SM), *Alcaligenes xylosoxidans* (AX) e *Burkholderia cepacia* (BC) (1).

Scopo dello studio è stato determinare la frequenza di isolamenti colturali e la prevalenza di colonizzazione di tali patogeni nei pazienti FC del Centro di Riferimento Campano.

Nel triennio 2000-2003 da 300 pazienti, in regolare follow-up, sono stati raccolti almeno 4 campioni di espettorato o aspirato bronchiale/anno. Su 3986 campioni (3348 espettorati, 638 aspirati bronchiali) sono stati effettuati:

- esami microscopici e colturali;
- saggi di identificazione;
- studio di chemiosensibilità *in vitro* sia per diffusione che per microdiluzione.

La frequenza di isolamenti è stata del 6.6% (265 isolati) per SM, 3.8% (155 isolati) per AX e 11% (444 isolati) per BC, con aumento sia per SM che per AX di anno in anno (per SM: 3% nel 2000, 5.6% nel 2001, 7.4% nel 2002, 9.9% nel 2003; per AX: 2.1% nel 2000, 2.5% nel 2001, 4.9% nel 2002, 5.5% nel 2003); per BC la frequenza è stata del 12% nel 2000-01, 10% e 9.4% rispettivamente nel 2002 e 2003, verosimilmente per il miglioramento delle strategie di isolamento dei pazienti. 85 pazienti (28%) risultano colonizzati da SM, 49 (16%) da AX e 42 (14%) da BC.

In conclusione, l'espansione dell'eziologia microbica è prevalentemente correlata alle modificazioni della terapia antibiotica. La prevalenza di questi organismi è in parte sovrapponibile a quella del Nord-America (2), pur sotto diverse influenze ambientali. Non è ancora noto il ruolo di questi patogeni emergenti sul decorso clinico.

P063

ASSOCIAZIONE TRA COLONIZZAZIONE NEONATALE DA UREAPLASMA UREALYTICUM E BASSO PESO ALLA NASCITA

M.A. Latino*, G. De Intinis*, P. Intorcchia*, M. Peretto*, L. Bello**, G. Prandi***

*S.S.Dip. Batteriologia Az. Osp. O.I.R.M. - Sant'Anna, Torino

** Dipartimento di Discipline Ginecologiche e Ostetriche, Cattedra "B", Università di Torino.

*** Dip. Scienze Pediatriche e dell'Adolescenza - Università di Torino

Introduzione: La colonizzazione cervico-vaginale in donne gravide da parte di *Ureaplasma urealyticum* è stata associata alla nascita di neonati con basso peso sebbene *U. urealyticum* faccia parte della flora commensale delle vie genitali femminili. Il meccanismo d'azione sarebbe da mettere in relazione con l'instaurarsi di un processo infiammatorio a livello della placenta che interferirebbe con l'apporto di sostanze nutritive al feto, determinandone l'iposviluppo. Diversi studi hanno dimostrato che esiste una correlazione tra le infezioni del sistema respiratorio da parte di *U. urealyticum* e lo sviluppo di patologie polmonari neonatali.

Obiettivi: Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare la colonizzazione da parte di *U. urealyticum* in neonati pretermine con basso peso alla nascita (<1.500 gr.) rispetto ad un gruppo di neonati a termine e con peso \geq 2.500 gr.

Si è cercato di evidenziare, nella nostra popolazione, eventuali correlazioni fra la presenza di questo microrganismo e complicanze ostetriche e neonatali quali la rottura prematura delle membrane, il parto pretermine e l'insorgenza di una patologia respiratoria neonatale.

Metodi: Sono stati studiati complessivamente 262 neonati di cui 194 nati pretermine con peso, alla nascita, <1500gr, e 68 nati a termine con peso \geq 2.500 gr. considerati come gruppo di controllo.

Su tutti sono stati eseguiti un tampone auricolare ed un tampone faringeo per valutare la colonizzazione da parte di *U. urealyticum*. I prelievi per l'esame colturale sui neonati sono stati effettuati in sala parto alla nascita. Sono stati inoltre raccolti i dati clinici relativi ai neonati esaminati e alle rispettive madri (età gestazionale, peso del neonato, rottura prematura delle membrane, tipo di parto, problemi respiratori del neonato etc.).

U. urealyticum è stato ricercato utilizzando il metodo di coltura il terreno liquido Mycofast Evolution 2 (International Microbio) considerando positive colture con conta batterica superiore a $10^{4.3}$ U.C.C. (unità cambianti colore).

Risultati: Una colonizzazione da parte di *U. urealyticum* è stata evidenziata in 30 (15.5%) dei neonati con basso peso alla nascita e solo in un (1.5%) neonato a termine con peso \geq 2.500 gr. ($p < 0.025$).

Significativo sembra essere il tipo di parto, infatti una colonizzazione interessava 10 neonati su 24 (41.7%) nati con parto spontaneo e 18 (12%) dei 150 nati con taglio cesareo ($p < 0.001$). In 20 casi il tipo di parto non è stato determinato.

Una rottura prematura delle membrane (PROM) si è verificata in 60 casi con colonizzazione in 21 (35%) vs i 9 (6.7%) dei 164 casi in cui tale complicanza ostetrica non si è manifestata ($p < 0.001$). Più in particolare nel 70% (21/30) dei neonati colonizzati (gruppo A) si era verificata una PROM e solo nel 23.8% (9/164 $p < 0.001$) di quelli non colonizzati (gruppo B).

Per quanto riguarda l'insorgenza di patologie respiratorie il nostro studio ha messo in evidenza un maggior ricorso alla respirazione artificiale nei neonati del gruppo A. Infatti, i

neonati intubati subito dopo la nascita sono stati l'80% in questo gruppo (24/30) e solo il 58.7 % nel gruppo B (98/164 $p < 0.05$).

Un'insufficienza respiratoria è insorta nel 20% dei neonati colonizzati (6/30) e nel 15.8% (26/164) dei non colonizzati. Una broncodisplasia polmonare (BDP) è stata osservata nel 16.7% (5/30) del gruppo A e nel 9.1% (15/164) del gruppo B. Questi ultimi due dati non sono statisticamente significativi anche se indicano una maggiore predisposizione a tali patologie dei neonati con colonizzazione da *U. urealyticum* e sono comunque in accordo con i dati della letteratura internazionale dai quali si evince come il ruolo di questi microrganismi, nell'insorgenza di tali patologie, debba essere ancora studiato in maniera più approfondita.

L'evento estremo in cui si è osservato il decesso dei neonati è stato riscontrato sia nel gruppo A che nel gruppo B, ma con una netta prevalenza tra i nati colonizzati dove la percentuale di mortalità è stata del 23.3% (7/30), contro il 5.58% (9/164) del gruppo B ($p < 0.001$).

Nel gruppo dei 68 neonati a termine con peso ≥ 2.500 gr. non si è avuto nessun caso in cui si sia dovuto ricorrere all'intubazione né l'insorgenza di patologie respiratorie. Nessuno di essi è deceduto.

Conclusioni: Da questo studio emerge l'elevata frequenza di colonizzazione da *U. urealyticum* nei neonati con basso peso alla nascita rispetto ai nati a termine con peso ≥ 2.500 gr. e che essa è significativamente correlata al parto vaginale ed alla rottura prematura delle membrane mentre andrebbe ulteriormente valutato il ruolo di questi microrganismi nell'insorgenza di patologie respiratorie. I risultati ottenuti ci consentono comunque di proporre l'esecuzione di un prelievo cervico-vaginale in gravidanza per la ricerca di tali microrganismi ed una eventuale terapia mirata per ridurre il numero dei neonati a rischio di complicanze più o meno gravi e che potrebbero esitare anche in un decesso.

P064

INFEZIONI COMUNITARIE E NOSOCOMIALI DELLE BASSE VIE AEREE PRESSO L'AZIENDA OSPEDALIERA FATEBENEFRATELLI E OFTALMICO DI MILANO.

Malandrin S. M. I.*, Rimoldi S. G.*, Calzaferri G.*, Defendenti C.*, Saudelli M.*

*Azienda Ospedaliera Fatebenefratelli e Oftalmico, Corso di Porta Nuova 23, Milano.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la prevalenza di infezioni nosocomiali e comunitarie delle basse vie aeree tra i pazienti ricoverati nella nostra Azienda Ospedaliera attraverso un'analisi retrospettiva delle cartelle cliniche e dei test di laboratorio durante un periodo di circa 10 mesi dal maggio 2003 a marzo 2004.

A tal scopo sono stati analizzati 258 campioni delle basse vie aeree (espettorati, broncoaspirati, broncolavaggi), raccolti in 146 pazienti ricoverati nei reparti di medicina e rianimazione. L'analisi delle cartelle cliniche dei pazienti ha permesso di interpretare i risultati degli esami colturali e quindi di distinguere le infezioni/colonizzazioni di origine nosocomiale da infezioni di origine comunitaria attraverso un criterio sia temporale (infezione nosocomiale se data richiesta esame positivo > 72 h) sia clinico (motivo del ricovero, DRG).

I dati ottenuti indicano che dei 146 pazienti circa il 19% ha contratto un'infezione delle basse vie aeree in comunità, il 32% dimostrava una colonizzazione o infezione contratta durante la degenza mentre il 48% non riportava infezione di origine batterica documentabile. In un caso, un paziente

ricoverato per una polmonite da *S.pneumoniae*, contraeva nel corso della degenza una superinfezione da *P.aeruginosa* e *S.aureus* MR di chiara origine nosocomiale. In una piccola percentuale di casi ($< 3\%$) non è stato infine possibile, in base alle informazioni raccolte, valutare il significato clinico dei reperti di laboratorio.

Fra i pazienti con infezione comunitaria i principali microrganismi reperiti sono stati: *S.pneumoniae* (44%), *H.influenzae* (16%) e *C.albicans* (8%).

Per quanto riguarda i pazienti con infezione/colonizzazione nosocomiale, i principali microrganismi reperiti sono stati: *P.aeruginosa* (27%), *S.aureus* (27%), *C.albicans* (13%) e *S.maltophilia* (6%) *Enterobacteriaceae* del gruppo KES (12%).

L'alta prevalenza delle infezioni/colonizzazioni di origine nosocomiale ritrovate in questo studio, soprattutto nel reparto di rianimazione e cure intensive, pone un particolare accento sulla necessità di intervenire con un'efficace programma di controllo delle infezioni ospedaliere.

P065

VALUTAZIONE PRELIMINARE DEL SISTEMA CHORUS PER L'ANALISI DELLE IgG ANTI -HELICOBACTER PYLORI.

Mazzarelli G.*, Parri F.*, Petreni S.†, Soldatini C.†, †Buccato P; Tognini M.†

* Laboratorio di Sieroimmunologia A.O.U.C. Careggi, viale Pieraccini 17 Firenze.

†DIESSE Diagnostica Senese SpA, via delle rose 10, Monteriggioni (SI)

Nel flusso di lavoro di un laboratorio di sieroimmunologia quale il nostro, accanto alla routine dei grandi numeri esiste tutta una tipologia di test eseguiti in numeri non molto elevati (dai 1000/anno a decrescere), che costituiscono un piccolo problema organizzativo, in quanto - soprattutto quando siano eseguiti con metodica ELISA - debbono essere raggruppati ed eseguiti in giorni fissi della settimana (con allungamento del "turn-around time"). Essi inoltre comportano impiego notevole di personale (in quanto sono spesso eseguiti con metodica manuale) e sono fonte di sprechi e di costi nascosti (dovuti ad esempio all'esecuzione dei controlli e/o calibratori in ogni seduta), che incidono sul costo finale del test. In questo lavoro, abbiamo eseguito una valutazione preliminare di un nuovo sistema analitico, basato sulla metodica EIA con uso di dispositivi a singolo test pronti all'uso, il Chorus della DIESSE Diagnostica Senese SpA, utilizzando un kit per la determinazione delle IgG anti-*H. pylori* (circa 550 test/anno), paradigmatico di questa "problematica". Come kit di confronto abbiamo utilizzato l'Enzy-Well *H. pylori* IgG, sempre della DIESSE Diagnostica Senese SpA, attualmente in uso presso il nostro laboratorio.

Sono stati analizzati 113 campioni di routine, ottenendo una concordanza del 94% (55 positivi, 51 negativi). Per quel che riguarda i campioni discordanti, in 5 casi su 7 si trattava di campioni risultati negativi nel sistema Chorus e positivi con metodica manuale, con valori compresi tra 10 e 15 AU/mL, che corrispondono ai cut-off (rispettivamente pediatrico e adulti) del kit manuale. In conclusione, il sistema Chorus si è dimostrato concordante in maniera molto soddisfacente con la metodica in uso, presentando il vantaggio di consentire l'esecuzione giornaliera del test, accorciando i tempi di risposta.

P066**ENTEROCOCCHI VANCOMICINA RESISTENTI ISOLATI NELL'UOMO E IN ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE IN TOSCANA**

Mariottini A., Pedonese F.*, Sartini L.*, Pecile P.

Laboratorio di Microbiologia AO Careggi, Firenze

*Dipartimento di Patologia Animale,

Profiliassi ed Igiene degli Alimenti - Università di Pisa

Gli enterococchi sono largamente diffusi in natura e possono essere definiti microrganismi ubiquitari in quanto si trovano come comuni residenti del tratto gastrointestinale dell'uomo, di altri mammiferi, uccelli, rettili e insetti, ma anche in piante, rifiuti ed acque. In patologia umana stanno acquisendo sempre maggiore importanza a causa della loro multiresistenza agli antibiotici che può includere anche la resistenza ai glicopeptidi, al punto che l'isolamento di enterococchi vancomicina resistenti (VRE) è diventato sempre più frequente. Dai dati relativi ai campioni pervenuti al Laboratorio di Microbiologia e Virologia della AO Careggi di Firenze nell'anno 2003, su un totale di 1253 *Enterococcus faecalis* e di 201 *Enterococcus faecium*, isolati da pazienti ricoverati, i resistenti a vancomicina sono risultati rispettivamente il 3% ed il 48%. Percentuali di resistenza simili si sono riscontrate nei pazienti ambulatoriali (il 2% degli *E. faecalis* ed il 50% degli *E. faecium* isolati). Mentre un trasferimento di VRE dall'ambito nosocomiale a quello territoriale è già stato descritto, necessita di essere ulteriormente esplorata la possibilità di una colonizzazione dell'individuo non ospedalizzato imputabile alla fonte alimentare, anche se allo stato attuale non è mai stato dimostrato alcun caso di infezione da VRE a seguito di ingestione di un alimento contaminato. Infatti varie ricerche hanno evidenziato la presenza di VRE in alimenti di origine animale ed inoltre l'osservazione che alcuni isolati di origine umana siano genotipicamente non distinguibili da isolati di matrice non umana sembra supportare l'ipotesi che VRE possano trasmettersi dall'animale all'uomo tramite la catena alimentare. Allo scopo di verificare la circolazione di VRE nei prodotti alimentari di origine animale nella nostra regione sono stati esaminati 103 campioni alimentari di cui 57 carni e 46 lattiero-caseari acquistati presso supermercati ed ipermercati toscani nel periodo compreso tra luglio e dicembre 2003. Dall'analisi effettuata, mentre gli enterococchi sono risultati presenti in circa l'80% dei campioni, solo 3 campioni carni (2 di provenienza avicola ed 1 prodotto di salumeria) sono risultati positivi per *E. faecium* vancomicina resistenti. In tutti i ceppi isolati è stato possibile evidenziare con metodica PCR la presenza del gene di resistenza *vanA*.

Il riscontro di positività per VRE negli alimenti in esame evidenzia l'importanza di continuare il monitoraggio di tali possibili fonti di contaminazione, come del resto è testimoniato dai numerosi programmi di ricerca che in diversi paesi europei e negli USA indagano sulla trasmissione di VRE dagli alimenti all'uomo tramite la catena alimentare.

P067**GLICOCALICE E ANTIBIOTICO-RESISTENZA: STUDIO SU PAZIENTI PORTATORI DI DISPOSITIVI PROTESICI**

Catanea M.L., Cannistrà G., Rondinelli V., Saraceno R., Colosimo M., Morrone P., De Fazio G., Masciari R.

Virologia e Microbiologia Azienda Ospedaliera Pugliese - Ciccio Catanzaro.

Il glicocalice (o slime) è localizzato sulla superficie esterna di batteri Gram positivi e negativi.

Recenti studi dimostrano che batteri occasionalmente produttori di slime sono responsabili dello sviluppo di gravi infezioni in pazienti portatori di dispositivi protesici (cateteri, pacemaker, valvole, etc). L'adesione di tali batteri a tali dispositivi rende l'infezione più difficile da eradicare con terapia antibiotica e quindi prolunga il decorso clinico.

Scopo: in tale studio si è valutata l'associazione tra la positività allo slime test e l'incremento di antibiotico-resistenza in ceppi batterici di stafilococchi.

Metodi: colonie di stafilococchi provenienti da emocolture positive sono state poste in brodocoltura ed incubate staticamente per 24 ore a 37°C in terreno liquido TSB (Tryptone soya broth). Quindi, la brodocoltura è stata aspirata ed i batteri sono stati incubati con 10 ml di fucsina per 30 minuti e, dopo l'aspirazione del colorante, è stata effettuata la lettura dello slime. Contemporaneamente, lo stesso ceppo batterico è stato posto in piastre di coltura per l'identificazione e la valutazione della sensibilità antibiotica.

Risultati: Da Gennaio 2003 a Gennaio 2004 sono state analizzate 1396 emocolture, di cui 148 (10,6%) sono risultate positive per stafilococchi. I ceppi di stafilococchi più frequenti sono stati *S. epidermidis* (97: 65,5%) e *S. aureus* (18: 12,1%). La positività allo slime test è stata riscontrata più frequentemente in pazienti portatori di cateteri venosi centrali (CVC). Il confronto con l'antibiogramma ha dimostrato che solo gli Stafilococchi slime test positivi (+++) si associavano ad un incremento statisticamente significativo delle resistenze di tali batteri all'antibiogramma ($P < 0.01$), specie a penicilline, cefalosporine e fluorochinoloni. Gli Stafilococchi Slime test positivi (+ e ++) non mostravano invece elevati livelli di antibiotico-resistenza.

Conclusioni: da questi dati preliminari si evince che lo slime test rappresenta un utile supporto diagnostico per la valutazione dell'antibiotico-resistenza in pazienti portatori di dispositivi protesici con emocoltura positiva. Questo test, di bassissimo costo e di facile esecuzione, è un esempio di quanto sia importante per il clinico la stretta collaborazione con il microbiologo.

P068**VALUTAZIONE PRELIMINARE DEL SISTEMA CHORUS PER L'ANALISI DELLE IgM ANTI-TOXOPLASMA GONDII.**Mazzarelli G.*, Parri F.*, Petreni S.[§], Soldatini C.[§], Tognini M.[§]

*Laboratorio di Sieroimmunologia A.O.U.C., Careggi, viale Pieraccini 17 Firenze.

[§]DIESE Diagnostica Senese SpA, via delle rose 10, Monteriggioni (SI)

La determinazione degli anticorpi di classe IgM è un test molto importante nella valutazione dello stato immune di donne in

gravidanza. Tra i kit disponibili in commercio, il kit VIDAS Toxo IgM (BioMérieux) è sicuramente uno tra i più utilizzati grazie agli ottimi livelli di specificità e sensibilità del test. Recentemente, DIESSE Diagnostica Senese SpA ha sviluppato il sistema Chorus per l'esecuzione in automazione di test ELISA mediante l'uso di dispositivi pronti all'uso a singolo test. Nel presente lavoro abbiamo valutato preliminarmente il sistema Chorus per il dosaggio di anticorpi di classe IgM anti-*Toxoplasma*, confrontandolo con il sistema VIDAS, in uso di routine presso il nostro laboratorio. Sono stati analizzati in totale 232 campioni, in parte da routine ed in parte da sieroteca, al fine di valutare la concordanza del test Chorus *Toxoplasma* IgM con il test VIDAS Toxo IgM.

Su 232 campioni, 221 hanno dato risultato concordante tra i due sistemi diagnostici (95,3%); in particolare, 187 campioni risultavano concordemente negativi, 31 risultavano concordemente positivi e 3 risultavano dubbi con entrambi i metodi. Analizzando più in dettaglio i campioni discordanti, si notava che in 5 casi su 11 si trattava di campioni risultati positivi nel sistema Chorus e dubbi nel sistema VIDAS; inoltre, gli indici di positività di tali campioni risultavano poco al di sopra di 1.2 (limite superiore della zona grigia, per il sistema Chorus). In 3 casi su 11, il risultato Chorus era dubbio (indice 0.9) e negativo per VIDAS. Per quel che riguarda i restanti 3 campioni discordanti, 2 risultavano dubbi con il Chorus e debolmente positivi con il VIDAS; un campione risultava negativo (indice 0.7) con il Chorus e dubbio con il VIDAS (0.55, limite inferiore della zona grigia). In conclusione, lo strumento Chorus fornisce dei risultati in buon accordo con quelli forniti dallo strumento VIDAS, con il quale condivide la ridotta manualità propria dei sistemi basati su dispositivi pronti all'uso a singolo test.

P069

TASSONOMIA MOLECOLARE DI *B. ANTHRACIS* MEDIANTE ANALISI VNTR.

Muscillo¹ M.; La Rosa¹ G.; Sali¹ M.; De Carolis¹ E.; Adone² R.; Ciuchini² F.; Fasanella³ A.

¹Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

²Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Sanità Alimentare ed Animale, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata, Foggia.

La classificazione genetica di *Bacillus anthracis* è importante per una corretta definizione del rischio nel caso di rilevamenti occasionali in campioni ambientali o in sospette contaminazioni di natura dolosa. L'approccio biologico richiede spesso un tempo incompatibile con le esigenze sanitarie e di pubblica sicurezza. L'approccio tradizionalmente usato è l'analisi multilocus delle sequenze ripetute in tandem detta VNTR. Tale metodica si basa sull'analisi delle grandezze dei prodotti PCR di 6 loci cromosomiali e 2 plasmidici. Questa metodica è molto rapida ma è suscettibile di interpretazioni soggettive in quanto strettamente dipendente dalle caratteristiche strumentali e dal software utilizzato per l'interpolazione dei pesi molecolari.

In questo lavoro sono stati sequenziati gli 8 loci di 4 ceppi virulenti, e di due ceppi vaccinali (Carbosap, Pasteur II) di *B. anthracis*. Ciò ha permesso, per ogni locus esaminato, di mettere a punto una configurazione testuale basata sulla sequenza del repeat, sul numero minimo e massimo di ripetizioni e sulle loro zone fiancheggiatrici. Ciascuna configura-

zione è stata utilizzata con il programma FINDPATTERNS, del pacchetto Wisconsin GCG, per la scansione delle sequenze del *B. anthracis*, dei ceppi *KrugerB*, *WesternNA*, *Florida* ed *Ames*.

Nei campioni analizzati, le grandezze "apparenti" dei frammenti espressi in bp, erano spesso discordanti dalle grandezze "reali" calcolate mediante analisi delle sequenze. Il confronto delle rappresentazioni ad albero dei profili genetici ottenuti o con le grandezze apparenti dei frammenti o con le *TRN*, davano lo stesso risultato. La caratterizzazione del campione con il primo metodo necessita di campioni di riferimento a genotipo noto. Con il secondo metodo, il profilo genetico dei campioni in esame può essere confrontato con quelli dedotti *in silico* utilizzando sequenze presenti in banche dati e quindi si presta meglio a studi epidemiologici ed evolutivi.

P070

SENSIBILITA' DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* A PRODOTTI NATURALI

Fabio A.^{*}, Forte E.^{**}, Fabio G.^{***}, Martino A.^{**}, Nanni H.^{****}

^{*} Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

^{**} Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche Università di Modena e Reggio Emilia.

^{***} Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università di Modena e Reggio Emilia

^{****} Agenzia Regionale Prevenzione Ambiente (ARPA) Rimini

Nell'ambito della specie *Escherichia coli* il gruppo degli enteroemorragici (EHEC) contiene i ceppi produttori di verocitotossine detti verocitotossici (VTEC) causa di infezioni alimentari in diverse parti del mondo con un quadro nosologico che include diarrea, spesso ematica, colite emorragica (HC) e sindrome emolitico-uremica (HUS). Alcuni ceppi producono solo VT₁ o VT₂ o ambedue. L'habitat principale è costituito dall'intestino dei bovini; l'infezione umana è causata prevalentemente dal consumo di alimenti carni. Il sierogruppo O157 è associato soprattutto ad episodi di epidemie; O111, O26 sono sempre più frequentemente causa di casi sporadici. Ci è sembrato quindi opportuno saggiare su i predetti microrganismi l'effetto di prodotti naturali quali spezie, derivati e campioni di vino utilizzati nella preparazione di cibi carni.

L'attività antibatterica è stata determinata su tre ceppi di *Escherichia coli* VT positivi (O157:H7, O111, O26) di isolamento clinico*. Spezie essicate tritate (cannella, chiodi di garofano, origano, rosmarino, salvia, timo) al 3% sono state aggiunte separatamente a terreno liquido contenente 0,5 Mc Farland di ciascun ceppo, incubato e seminato in piastra dopo 1, 4 e 7 giorni. I corrispondenti oli sono stati saggati a concentrazione commerciale secondo Kirby Bauer. Aliquote di 0,5 Mc Farland sono state aggiunte al vino. Le sospensioni ottenute, mantenute a temperatura ambiente, venivano seminate in piastre, poi incubate, dopo 10, 20, 30, 60, 120 minuti.

Non si sono riscontrate differenze tra gli stipiti saggati.

Tra le spezie è risultata particolarmente attiva la cannella seguita dalla salvia, soprattutto il primo giorno, con una netta diminuzione dell'attività nel tempo; tra i derivati cannella, origano e timo hanno mostrato notevoli capacità inibitorie mentre l'olio di salvia è risultato inefficace. Il contatto con il vino ha eliminato *E. coli* in 60 minuti con un forte abbassamento della carica dopo 10'. I controlli effettuati mostrano

che l'effetto battericida non è attribuibile al contenuto alcolico.

* Ceppi gentilmente forniti dal dott. Caprioli, ISS.

P071

EFFETTO DI ESTRATTI DI PIANTE AROMATICHE SU DI UN BATTERIOFAGO DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Fabio A., ** Nicoletti P ***Martino A.

*Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

**Ospedale Careggi, Firenze

***Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche, Biostatistiche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

Nell'ambito di una indagine sulle proprietà antibatteriche, antimicotiche ed antivirali di piante e derivati, abbiamo studiato l'effetto degli oli essenziali di chiodi di garofano, lavanda, origano e rosmarino su ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* isolati da campioni clinici. E' noto che ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* possono essere parassitati da numerosi tipi di batteriofagi. La loro presenza viene in genere evidenziata dalla presenza di aree di lisi prodotte sui batteri durante la fase di crescita. Nelle indagini preliminari sono stati selezionati ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* isolati da casi clinici; alcuni (10%) presentavano evidenti aree litiche su piastre di terreno di isolamento dopo osservazione di alcuni giorni. I ceppi selezionati, seminati su piastre di Agar Sangue e di Mueller Hinton, sono stati messi in contatto con dischetti di carta bibula imbevuti degli oli in esame in concentrazione commerciale. Sono stati allestiti controlli positivi e negativi. Le piastre sono state mantenute a temperatura ambiente per alcuni giorni. Attorno agli aloni di inibizione della crescita (assenti nel caso della lavanda, di 12 e 13 mm per origano e rosmarino, 16 per i chiodi di garofano) per diametri di circa 40 per lavanda e rosmarino, di 55 per origano e di 60 per i chiodi di garofano, si è verificata l'assenza di aree di lisi peraltro presenti nelle rimanenti parti delle piastre. I risultati del tutto preliminari consentono di ipotizzare non tanto una possibile interferenza della sostanza sul ciclo litico di un determinato fago, quanto il fatto che il fago perda la capacità di agire su una cellula batterica modificata che potrebbe non essere più attaccabile dal fago.

P072

UNA DIAGNOSI PRECOCE DI INFEZIONE DA *BORRELIA BURGDORFERI*

Nisticò S., Potente G.I., Leone R.A., Minchella P., Folino C., Berardelli G.*, Quintieri F.*, Griffo G.*, Callipari E.*, Citriniti A.*, Petronio A.*, Luciano A.

U.O. di Microbiologia e Virologia, *U.O. di Malattie Infettive, AS n. 6 Lamezia Terme

Scopo: Valutare l'utilità della precoce diagnosi sierologica nel sospetto di *Borreliosi*, malattia endemica trasmessa da zecche della specie *ricinus*, parassiti di numerosi mammiferi, sia domestici che selvatici. Dopo la puntura dell'artropode, gli agenti infettanti (genere *Borrelia*) possono moltiplicarsi nei linfonodi regionali (adenopatia) e/o diffondere per via ematica e localizzarsi in vari organi. Clinicamente l'infezione può manifestarsi attraverso la cosiddetta *malattia di Lyme* (eritema migrante, artralgie, neuropatia) oppure attra-

verso la *febbre ricorrente* di tipo epidemico, presente soprattutto in aree geografiche dove le condizioni igieniche e sociali sono ancora oggi molto scadenti.

Materiali e metodi: Nel mese di maggio 2003 è giunta alla nostra osservazione, inviata dal Pronto Soccorso, una donna di 52 anni alla quale era stata rimossa una zecca. La paziente non mostrava segni e sintomi di particolare interesse tuttavia, a scopo profilattico, è stata proposta una terapia con doxicillina 200mg/die per 21 giorni. Gli esami ematochimici eseguiti al momento del ricovero mostravano una modesta monocitosi con lieve aumento della VES.

La diagnostica sierologica è stata effettuata eseguendo prima la ricerca di anticorpi anti-*Borrelia* di classe IgG ed IgM con metodica immunoenzimatica (EIA) della ditta MIKROGEN (distribuita da DiaSorin), che utilizza antigeni ricombinanti di *Borrelia burgdorferi* e, successivamente, un test di secondo livello con metodica western blot (*Borrelia burgdorferi* WB AID GmbH, distribuito da AMPLIMEDICAL).

Risultati: Il test EIA è risultato **positivo** per la ricerca di IgM e **dubbio** per la ricerca di IgG; il test WB ha confermato la fase acuta di malattia, evidenziando la presenza di anticorpi di classe IgM per la banda aspecifica p41 (flagellina) e per le "bande altamente specifiche" della fase acuta p25 (osp C) e p34 (osp B).

Discussione e conclusioni: Riteniamo opportuno dover ricercare gli anticorpi anti-*borrelia* in tutti quei pazienti che riferiscono all'anamnesi una puntura di zecca, anche se asintomatici; infatti lo stadio iniziale dell'infezione non si accompagna ad alcuna sintomatologia. Tale procedura diagnostica è da noi applicata al fine di porre una diagnosi precoce di infezione e predisporre così un immediato trattamento terapeutico atto ad evitare l'instaurarsi di malattia.

P073

UN CASO CLINICO DI RICKETTSIOSI DEL GRUPPO FEBBRE MACULOSA

Nisticò S., Potente G.I., Leone R.A., Minchella P., Folino C., Quintieri F.*, Berardelli G.*, Lucchino D.*, Surace L.A.*, Petronio A.*, Luciano A.

U.O. di Microbiologia e Virologia,

*U.O. di Malattie Infettive, AS n. 6 Lamezia Terme

Scopo: Valutazione diagnostica di un caso clinico di Rickettsiosi. Le specie del genere *Rickettsia* sostengono infezioni con varia sintomatologia; quasi sempre tuttavia è presente esantema con localizzazione variabile ed un'escara nella sede della puntura dell'artropode vettore. Il serbatoio naturale delle Rickettsie è costituito da numerosi mammiferi, in particolare piccoli roditori selvatici; l'uomo è solo un ospite occasionale.

Materiali e metodi: Nel mese di settembre 2002 è giunta alla nostra osservazione una donna di 77 anni ricoverata per febbre di natura da determinare. Al momento dell'ammissione la paziente, residente in una zona rurale del circondario, presentava iperpiressia con brividi e sudorazione profusa, artromialgia e cefalea; tali sintomi erano presenti da oltre una settimana. All'esame obiettivo si riscontrava un esantema maculo-papuloso diffuso ed un'escara in corrispondenza della regione del fianco sinistro. Nella stessa sede, circa una settimana prima dell'insorgenza della sintomatologia, era stata avvertita una puntura non ben identificata. Gli esami ematochimici eseguiti al momento del ricovero mostravano leucocitosi con aumento dei granulociti neutrofili, monocitosi, linfopenia ed un considerevole aumento della VES. Il sospetto diagnostico di Rickettsiosi è stato confermato con la ricerca su siero di anticorpi anti-Rickettsie di classe IgG ed

IgM, eseguendo un test basato su tecnica di immunofluorescenza (Focus USA, distribuito da ALIFAX), che utilizza su unico pozzetto antigeni distinti di *R. typhi* e di *R. rickettsii*, permettendo una differenziazione tra anticorpi anti-*Rickettsia* gruppo febbre tifoide ed anticorpi anti-*Rickettsia* gruppo febbre maculosa. Il test di sieroagglutinazione Weil-Felix da noi utilizzato è prodotto dalla Ditta Murex.

Risultati: Il campione in esame ha rivelato una positività per la ricerca di IgG anti-*Rickettsia* gruppo febbre maculosa maggiore di 1:256 e di IgM maggiore di 1:50. La sieroagglutinazione di Weil-Felix, all'inizio negativa, si è positività con titolo 1:160 per l'antigene OX2, soltanto una settimana dopo.

Discussione e conclusioni: Riteniamo, alla luce di quanto riportato, che nei pazienti con anamnesi positiva per puntura di insetto e che manifestino febbre e/o rash cutaneo, la sola esecuzione della sierodiagnosi di Weil-Felix non sia sufficiente. E' quindi importante, al fine di una precoce diagnosi etiologica, utilizzare un test che abbia non solo tempi di esecuzione brevi, ma che sia più sensibile e specifico; la metodica in immunofluorescenza possiede queste caratteristiche e, non richiedendo strumentazione dedicata se non un microscopio a fluorescenza, può essere utilizzata in tutti i laboratori di microbiologia.

P074

RESISTENZA MEDIATA DA METALLO-BETA-LATTAMASI IN *P. AERUGINOSA* IN UNA STRUTTURA RIABILITATIVA.

^aMigliavacca R., ^bNavarra A., ^cTelecco S., ^aNucleo E., ^dSpalla M., ^aAsticcioli S., ^aZara F., ^aPagani L.

^aDip. S.M.E.C. sez. di Microbiologia, Università di Pavia, via Brambilla 74, 27100 Pavia;

^bLab. di Microbiologia IRCCS "Fondazione S. Maugeri" via Ferrata 8, 27100 Pavia;

^cServizio Analisi Microbiologiche IRCCS "S. Matteo", p.le Golgi, 27100 Pavia.

Obiettivi - Monitorare la diffusione della resistenza ai carbapenemici, mediata da metallo-β-lattamasi, in ceppi di *P.aeruginosa* isolati in una struttura riabilitativa che accoglie pazienti provenienti da ospedali distribuiti sul territorio nazionale.

Metodologia - In 81 isolati di *P.aeruginosa*, raccolti nel periodo giugno '02-dicembre '03, resistenti all'imipenem, è stata determinata la MIC con micrometodo in terreno liquido secondo i protocolli NCCLS. Su tutti i ceppi è stata valutata l'azione sinergica tra imipenem ed EDTA mediante E-test MBL (AB-Biodisk) e tra imipenem ed EDTA + 1,10-o-fenantrolina utilizzando un test di microdiluzione in terreno liquido (EPI-test). I determinanti di resistenza sono stati individuati con PCR mediante primer specifici per i geni *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* e successivo RFLP del prodotto di amplificazione. Ai fini della tipizzazione è stata effettuata un'analisi dei profili di macrorestrizione genomica (PFGE).

Risultati - I ceppi risultati resistenti all'imipenem in base alla diffusione da dischetto erano caratterizzati da MIC di 8->256 µg/ml. La restituzione dell'attività dell'imipenem, dovuta alla azione di EDTA + 1,10-o-fenantrolina, si è verificata in 15 isolati (18.5%) di *P.aeruginosa*, nei quali è stata dimostrata la produzione di metallo-β-lattamasi di tipo VIM, mentre 66 ceppi con MIC comprese fra 4-256 µg/ml sono risultati negativi a questo test. In tutti i casi l'EPI-test ha evidenziato la produzione di metallo-enzima, mentre in 5 casi l'E-test è risultato negativo. Le MIC per l'imipenem dei ceppi metallo-enzima-produttori erano comprese tra 8 e >256µg/ml. 7 stipti produttori di VIM-1 sono risultati epi-

demiologicamente correlati, mentre è stata evidenziata la diffusione di 3 altri pulsotipi solo sporadicamente presenti.

Conclusioni - L'utilizzo di test di sinergia con inibitori per il riconoscimento delle metallo β-lattamasi è di facile applicazione nei laboratori diagnostici, ed auspicabile, vista l'incidenza dei casi di resistenza dovuta alla persistenza e diffusione di diversi cloni metallo-β-lattamasi produttori nella nostra area geografica.

P075

RESISTENZA MEDIATA DA BETA-LATTAMASI IN ISOLATI CLINICI DI *ACINETOBACTER BAUMANNII* MDR.

^aMigliavacca R., ^bNavarra A., ^cEndimiani A., ^aNucleo E., ^dSpalla M., ^bTelecco S., ^eLi Bergoli M., ^dGiacobone E., ^fLuzzaro F., ^fRossolini G.M., ^aPagani L.

^aDipartimento S.M.E.C. sez. di Microbiologia, Università di Pavia, via Brambilla 74, 27100 Pavia;

^bLab. di Microbiologia - IRCCS "S. Maugeri" via Ferrata 8, 27100 Pavia;

^cLab. di Microbiologia - Ospedale di Circolo e Fond. "Macchi", viale Borri 57, 21100 Varese;

^dServizio Analisi Microbiologiche IRCCS "S. Matteo", p.le Golgi, 27100 Pavia;

^eLab. di Microbiologia - IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza", 71013 S. Giovanni Rotondo (FG);

^fDipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, viale Bracci, 53100 Siena.

Obiettivi: Studio delle β-lattamasi prodotte da isolati clinici di *Acinetobacter baumannii* multiresistenti (MDR) responsabili di infezioni nosocomiali e delle loro relazioni clonali.

Metodologia: 38 ceppi di *A. baumannii* isolati nel 2003 in 4 ospedali da reparti di TI, clinici, chirurgici e riabilitativi, e caratterizzati da un profilo di multiresistenza, sono stati studiati per la produzione di β-lattamasi. Gli isolati erano ottenuti in gran parte da urine (26.3%) e secrezioni delle vie respiratorie (39.5%), ma anche da sangue (15.8%) e materiali diversi (18.4 %). Tutti gli isolati sono stati identificati e saggiati per la sensibilità agli antibiotici con card GNI (Vitek System, BioMérieux) e pannelli NMIC/ID4 (Phoenix System, Becton Dickinson). Le β-lattamasi ottenute in estratti grezzi sono state caratterizzate mediante determinazione del pI e dell'attività idrolitica sui substrati. La presenza dei geni *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}*, *bla_{VEB}*, *bla_{PER}*, *bla_{CTX-M}* e *amp^C* è stata studiata mediante PCR. Le relazioni clonali fra gli isolati sono state valutate mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE) usando l'enzima di restrizione *Sma*I.

Risultati: 32 ceppi sono risultati produttori di β-lattamasi AmpC cromosomiche ad elevati livelli, mentre 6 ceppi producevano β-lattamasi a spettro esteso (ESBL). I ceppi produttori di ESBL sono risultati non correlati clonalmente tra di loro, mentre gli stipti iperproduttori di AmpC cromosomica, isolati in Ospedali diversi, appartenevano prevalentemente ad un unico clone. In un reparto sub-intensivo *A. baumannii* MDR iperproduttore di AmpC ha dato origine ad un episodio epidemico.

Conclusioni: I risultati ottenuti dimostrano la circolazione in ambito ospedaliero di stipti di *A. baumannii* MDR spesso non correlati genotipicamente e caratterizzati da differenti meccanismi di resistenza agli antibiotici β-lattamici. A questo riguardo, l'iperproduzione di β-lattamasi di tipo AmpC sembra essere il meccanismo prevalente ma anche l'espressione di ESBL può determinare fenotipi multiresistenti di difficile trattamento.

P076

DETERMINAZIONE DI *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* IN CAMPIONI DI URINE MEDIANTE AMPLIFICAZIONE DI GENI PLASMIDICI

^Paglia M.G., *Orchi N., ^Frigiotti D., Visca P., ^Pucillo L.P.

^Laboratorio di analisi Chimico - Cliniche e Microbiologia -
Unità di Microbiologia Molecolare, * Dipartimento di
Epidemiologia, I.N.M.I. L. Spallanzani, IRCCS, Roma.

Chlamydia Trachomatis (CT) è un batterio intracellulare obbligato e parassita pressoché esclusivo della specie umana, nella quale provoca una molteplicità di quadri morbosi. In mancanza di terapia o di terapia inadeguata, l'iniziale cervicite nella donna o uretrite nel maschio possono condurre a malattia pelvica nella donna, a prostatite e/o epididimite nel maschio. La diagnosi di laboratorio di CT si avvale: (i) dell'esame colturale; (ii) di metodi diretti per la ricerca dell'antigene; (iii) di test sierologici; (iv) di vari saggi (anche commerciali) di amplificazione genica. I metodi non molecolari si sono dimostrati scarsamente specifici e/o sensibili, oppure esageratamente laboriosi. Le tecniche basate sull'amplificazione del DNA (PCR) possono invece offrire una valida base diagnostica nella individuazione ed identificazione di CT. A tale scopo sono state da noi utilizzate sequenze nucleotidiche specifiche localizzate nel plasmide criptico di CT. Questa scelta è stata fatta per aumentare la sensibilità del nostro sistema d'indagine, ospitando ciascuna cellula batterica circa 10 copie del plasmide.

Scopo. Verificare in soggetti con disturbi urogenitali la presenza di CT quale segno di infezione celata e/o persistente utilizzando campioni di urine.

Materiali e Metodi. Nel corso del 2003 sono stati inseriti nello studio 22 pazienti di età compresa tra 22 e 44 anni, afferenti al servizio CRAIDS. Di questi 13 erano maschi e riferivano sintomi di uretrite, mentre 9 erano femmine con disturbi ginecologici vari, quali bruciore, leucorrea, dolori pelvici. Per valutare la presenza di CT sono stati utilizzati esclusivamente campioni di urine (primo getto). Dopo l'estrazione del DNA batterico (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) è stata allestita una PCR con primers specifici per il plasmide endogeno di CT, caratterizzata da una sensibilità di 0.1 IFU (Inclusion Forming Units).

Risultati e Conclusioni. Quattro (18 %) dei campioni di urine sono risultati positivi, confermando i dati di prevalenza osservati in individui sintomatici afferenti a centri per le malattie sessualmente trasmesse. Il protocollo di amplificazione applicato in questo studio si è dimostrato estremamente valido nella ricerca del DNA di CT. La possibilità di impiegare urine (anziché campioni ottenuti con procedure invasive) rende attuabile l'utilizzo del saggio in programmi di screening su popolazioni selezionate.

P077

REVISIONE LETTERARIA DI CASI DOCUMENTATI DI TETANO PER STIMARNE INCIDENZA E PREVALENZA DI DAL 1980 AL 2003

Pecone L.F., Vecchi E.

Università di Modena e Reggio Emilia - Via Campi, 287;
tel. 059/2055456 - E-mail lufloren@yahoo.it

Obiettivo: Lo scopo del lavoro è quello di riassumere le

cause di un relativo aumento dell'incidenza del tetano, nonostante l'obbligatorietà mondiale alla vaccinazione.

Il tetano è una patologia infettiva acuta provocata da un bacillo Gram positivo (*Clostridium tetani*) sporigeno anaerobio obbligato, con letalità complessiva di circa il 45%. Si calcola che, attualmente, a livello mondiale si verifichino circa un milione di casi di tetano/anno: la maggior parte dei casi riguarda i Paesi in via di sviluppo. Nei paesi industrializzati l'andamento dell'infezione tetanica ha registrato un decremento dell'incidenza a partire dagli anni '50.

In Italia si è verificato tale decremento, ma a partire dal 1995 si nota un aumento delle notifiche in seguito a ferite o escoriazioni lievi, verificatesi a causa di incidenti domestici o di giardinaggio. La fascia di età maggiormente colpita è quella che va da 65 a 69 anni per il sesso maschile e 80-84 anni per quello femminile, le donne risultano più colpite degli uomini. Dalle schede di notifica emerge che nel 97% dei casi vi era assenza di vaccinazione antitetanica, mentre nel 3 % dei soggetti colpiti vi era una vaccinazione incompleta o un richiamo da più di 10 anni al momento del trauma.

Materiali e metodi: Ricerca e consultazione di banche dati bibliografiche on-line e cartacee utilizzando Pubmed e Medline

Risultati. Sono stati trovati 20 studi significativi ed utili allo scopo del presente lavoro. Tutti gli studi confermano che l'età dell'incidenza dell'infezione a seguito di ferite accidentali ed anche le motivazioni riportate rispecchiano, in percentuale, quanto sopra affermato. Solo uno studio condotto sulla popolazione egiziana, pubblicato nel 2002, riporta che in modo significativo, gli uomini (23,7%) risultavano meno protetti delle donne.

Discussione. Molti sono i punti critici e di discussione: innanzitutto, la mancanza di pubblicazione recenti, prova di un disconoscimento dell'argomento e della mancanza di interesse verso una patologia che, sebbene letale, viene oggi trascurata. Poi la carenza di studi che valutino la percentuale di popolazione protetta nei confronti del tetano e di test specifici per valutare la durata della protezione. Molte persone infette presentano un calendario vaccinale incompleto o addirittura assente, oppure non hanno fatto un richiamo dopo 10 anni.

P078

LIVELLI DI S-TETANO IgG IN SOGGETTI CHE ESEGUONO LA VACCINAZIONE ANTITETANICA

Pecone L.F.⁽¹⁾, Vecchi E.⁽¹⁾, Melchionda D.⁽¹⁾, Cagarelli R.⁽²⁾, Errani F.⁽²⁾, Nacci G.⁽²⁾, Ferrari A.⁽²⁾, Lambertini A.⁽²⁾

⁽¹⁾Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

⁽²⁾Igiene Pubblica - AUSL di Modena

Obiettivo

L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare i livelli di protezione contro la tossina del *C. Tetani* e le caratteristiche di popolazione di un gruppo di soggetti presentatisi spontaneamente nel periodo gennaio 2000-dicembre 2002 presso l'ambulatorio vaccinale dell'Igiene Pubblica dell'AUSL di Modena.

Metodi

Di ognuno dei 1.037 soggetti si è raccolto: il consenso, i dati anagrafici (cognome, nome, data e luogo di nascita, età, sesso e nazionalità), data d'esecuzione del prelievo, n. dosi somministrate, n. richiami, completamento o meno del ciclo vaccinale, assolvimento del servizio militare. Si sono poi calcolati: età media dei soggetti e deviazione standard dell'età, limite inferiore e superiore dell'età, frequenza assoluta e relativa del sesso dei soggetti, distribuzione per nazionalità

dei soggetti, flussi mensili degli accessi con distribuzione anche per nazionalità, frequenza assoluta e relativa di completamento e non completamento del ciclo vaccinale, correlazione tra nazionalità e livelli di protezione per tetano, correlazione tra sesso e livelli di protezione per il tetano, correlazione tra classi di età e livelli di protezione per il tetano e correlazione tra assolvimento del servizio militare e livelli di protezione per il tetano (si ricorda che si considerano dosaggi ematici di S-Tetano IgG <0.1 UI/ml non protettivi, tra 0.1 e 0.5 protettivi e >0.5 UI/ml immunità di lunga durata). Tutte le correlazioni si sono analizzate utilizzando il chi quadro X^2 .

Risultati

L'età media dei soggetti è di 42 anni e 2 mesi; la deviazione standard dell'età è di 12.91; il limite inferiore dell'età è 20 anni e quello superiore è 89 anni; i maschi sono stati 825 (79.6%) e le femmine 212 (20.4%); gli italiani sono stati 653 (63%) e gli stranieri 384 (37%) in prevalenza albanesi, marocchini, nigeriani, ghanesi, filippini e tunisini; l'anno di maggior afflusso è stato il 2002 con 861 soggetti ed in particolare il mese di settembre 2002 con 111 prelievi effettuati.

Conclusioni

I soggetti stranieri e italiani studiati risultano quasi ugualmente protetti nei confronti del tetano, come dimostrato dall'analisi statistica effettuata con il metodo del chi quadro ($X^2=12.04$; g.l.=2; $p<0.001$) quindi con alta significatività statistica.

Gli uomini sono più protetti rispetto alle donne ($p<0.01$); i soggetti nella classe di età 20-40 anni sono più protetti rispetto a quelli della classi 41-60 e 61-90 ($P<0.01$) e infine i soggetti che hanno assolto il servizio militare sono più protetti rispetto a quelli milite-esente ($p<0.01$).

P079

INCIDENZA DI INFEZIONI URINARIE NEI REPARTI PEDIATRICI DELL'OSPEDALE S.GIOVANNI-ADDOLORATA DI ROMA

Placanica P*, Bormioli Q*, Binello M.*, Recchia O*, Sereno S.**

Laboratorio di Microbiologia

Ospedale S.Giovanni-Addolorata-Roma

** Dip. Mal. Infettive e Tropicali

Università La Sapienza-Roma

Obiettivo: valutare l'incidenza di patogeni urinari nei reparti pediatrici dell'ospedale S.Giovanni-Addolorata di Roma.

Metodo: esame di 360 urinocolture provenienti dai reparti di Nipologia (99) e Breve Osservazione Pediatrica (PBO) (261) nel periodo ottobre 2002-settembre 2003.

Identificazione degli isolati batterici e studio della sensibilità agli antibiotici mediante sistema automatico Vitek 2 (Biomérieux).

Risultati: il 73.1% dei campioni è risultato negativo, e il 26.9% positivo (97/360). Sono risultati positivi 71/261 (27.2%) campioni in PBO e 26/99 (26.3%) in Nipologia. La maggior parte degli isolati è costituita da gramnegativi. I grampositivi costituiscono il 5% e i miceti il 3%. Gli isolati prevalenti si riferiscono a *E.Coli* (43.3%), *Proteus mirabilis* (23.7%), *Klebsiella spp.* (13.4%) e *Pseudomonas aeruginosa* (5%). *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas* sono più frequenti nella PBO.

Per quanto riguarda il profilo di sensibilità agli antibiotici, in entrambi i reparti, la maggior parte delle molecole testate appare efficace al 100% in vitro, su gran parte degli isolati, ad eccezione di: ampicillina, piperacillina, amoxicillina/ac. clavulanico, cefalotina, cefoxitina, che, in alcuni casi, mostrano attività parziale o assente.

Conclusioni: la casistica è esigua e non consente valutazio-

ni statistiche ineccepibili, ma costituisce il punto di partenza per il confronto con altri reparti pediatrici ospedalieri e per il controllo della popolazione microbica residente e della sua evoluzione nel tempo, e per il controllo delle resistenze batteriche.

P080

IDENTIFICAZIONE RAPIDA DEI BATTERI ANAEROBI DEL PARODONTO MEDIANTE PYROSEQUENCING

*Orrù G., *Pusceddu G., *Concas D., *Ciusa M.L., *Meroni E., *Montaldo C., *Piras V.

*O.B.L. (Oral Biotechnology Laboratory) Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Università degli Studi di Cagliari.

*BIOSENSE S.r.l. Cinisello Balsamo - MI

Questo lavoro descrive un sistema integrato colturale/molecolare per l'identificazione rapida (96 identificazioni in 5 ore) degli anaerobi presenti nel distretto parodontale umano, molti difficilmente identificabili con i sistemi tradizionali.

Il metodo è basato sul sequenziamento di un corto frammento di una regione ipervariabile del genoma che codifica per il gene 16S rRNA che presenta, per tali batteri, un elevato polimorfismo nucleotidico interspecifico. Sono stati eseguiti prelievi di placca sottogengivale di 20 pazienti (sani e parodontopatici). I campioni sono stati seminati in Columbia agar sangue ed incubati a 37°C per 7 giorni in anaerobiosi.

Il profilo nucleotidico del frammento "target" è stato ottenuto tramite sequenziamento in real time con metodo Pyrosequencing. La metodica ha richiesto: (i) l'amplificazione tramite PCR di un frammento di 286 bp del gene 16S rRNA, utilizzando un primer biotinilato in 5' (ii) la separazione del singolo filamento utilizzando una metodica con supporti a base di streptavidina, (iii) la successiva reazione di sequenziamento col sistema Pyrosequencing (Pyrosequencing AB Uppsala, Sweden). Durante la reazione di sequenza, per ogni base nucleotidica incorporata viene emessa radiazione luminosa (registrata sotto forma di pirogramma,) grazie ad un sistema enzimatico contenente luciferina. È stata creata inoltre una banca dati delle sequenze target mediante programma applicativo Bioedit che consente in tempo reale di identificare la sequenza.

Su 133 colonie analizzate le specie o generi maggiormente rappresentati sono: *Streptococcus constellatus* 25,6%; *Peptostreptococcus micros* 8,3%; *Actinomyces spp.* 7,5%; *Porphyromonas gingivalis* 3,8%; *Gemella spp.* 2,3%; *Clostridium perfringens* 1,5%; *Tannerella forsythensis* 1,5%; *Veillonella spp.* 1,5%; *Capnocytophaga spp.* 1,5%; *Fusobacterium nucleatum* 0,8%; *Selenomonas spp.* 0,8%; *Cardiobacterium spp.* 0,8%; *Microbacterium spp.* 0,8%; *Paenibacillus spp.* 0,8%; *Agrobacterium tumefaciens* 0,8%. I pazienti parodontopatici presentavano un'elevata percentuale delle specie ritenute patogene in bibliografia. Questa metodica può rappresentare un valido supporto al microbiologo nella diagnosi di laboratorio di malattia parodontale.

Ringraziamenti: Dott. Carlo Farachi (BIOSENSE S.r.l.)
Dott. Roberto Usai (DEPECO S.r.l.)

P081**ANTIBIOTICO-SENSIBILITA' DI CEPPI URINARI DI ENTEROCOCCO: PRIMA EVIDENZA DI E.FAECIUM RESISTENTE AI GLICOPEPTIDI.**

Ramon M., Della Lucia P., Rinaldo E., Trevisan F., Tomasi G..

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia Ospedale di Agordo (Belluno)

Nella nostra realtà operativa, enterococco rappresenta il microrganismo gram positivo più frequentemente isolato dalle urinoculture, secondo, in senso assoluto, solo ad *Escherichia coli*.

Nel periodo gennaio 2003 - gennaio 2004, sono stati isolati 182 ceppi urinari di *Enterococcus spp.*, provenienti da pazienti ambulatoriali, ricoverati nei reparti ospedalieri e istituzionalizzati in strutture R.S.A..

Lo studio di sensibilità agli antibiotici è stato effettuato con metodo Kirby-Bauer e prevedeva il saggio di ampicillina (10?g), amoxicillina + acido clavulanico (20+10?g), nitrofurantoina (300?g), eritromicina (15?g), tetraciclina (30?g), ciprofloxacina (5?g) e vancomicina (30?g) (*biodischi Oxoid*).

162 ceppi (89%) sono risultati sensibili all'ampicillina, 164 (90%) all'associazione amoxicillina-clavulanato, 170 (93%) alla nitrofurantoina, 57 (31%) all'eritromicina, 48 (26%) alla tetraciclina, 64 (35%) alla ciprofloxacina mentre 176 isolati (96,7%) presentavano sensibilità alla vancomicina.

Solo 17 ceppi (9,3%) erano sensibili a tutte le molecole testate e provenivano nel 76% dei casi da pazienti ambulatoriali; 9 isolati (4,9%), provenienti tutti da pazienti ricoverati ed istituzionalizzati, presentavano un profilo di multiresistenza ma erano ancora sensibili alla vancomicina; 6 ceppi (3,3%) erano resistenti a più molecole, inclusa la vancomicina.

Il profilo di sensibilità di questi VRE, identificati tutti come *Enterococcus faecium* con *Rapid ID32 STREP (Biomerieux)*, è stato confermato con un saggio in terreno semisolido in condizioni molto simili a quelle delle tecniche di riferimento di microdiluizione e a lettura automatica (*ATB ENTEROC 5 -Biomerieux*).

E' stato così evidenziato un *pattern* comune ai 6 ceppi: sensibilità a tetraciclina, cloramfenicolo, quinupristina-dalfopristina, comportamento intermedio a nitrofurantoina, resistenza sia a vancomicina sia a teicoplanina con un probabile fenotipo VanA. L'indagine epidemiologica ha evidenziato la provenienza dei ceppi VRE da quattro pazienti, donne, d'età media 83 anni, con patologie croniche, accomunate tutte da una degenza prolungata presso lo stesso reparto ospedaliero. Questo studio rappresenta la prima evidenza di VRE nel nostro bacino di utenza. Esso dimostra come il laboratorio di microbiologia costituisca un anello indispensabile nella rete di sorveglianza dei batteri antibiotico-resistenti, permettendo al clinico sia di attuare tempestivamente le idonee misure di contenimento della loro diffusione sia, più in generale, di effettuare scelte terapeutiche ragionate alla luce dei dati epidemiologici locali.

P082**ECOLOGIA BATTERICA ED EPIDEMIOLOGIA DELLE RESISTENZE IN ALCUNE U.O. DELL'OSPEDALE MAGGIORE DI MILANO**

Ranzi ML., Lenza AR., Grancini A., Maraschini A., Frassanito A., Lusuardi M.

Lab.Centrale Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia IRCCS Ospedale Maggiore - Milano

Obiettivi

Il nostro lavoro ha inteso osservare l'ecologia batterica di alcune Unità Operative a maggior rischio infettivo e valutare le sensibilità dei microrganismi di più frequente isolamento.

Metodi

Sono stati considerati i campioni biologici provenienti da pazienti ricoverati nell'anno 2003 in Unità di Terapia Intensiva Generale (UTI), Chirurgia d'Urgenza (CDU), Centro Trapianti di Fegato (CTF) ed Ematologia.

Nel conteggio non sono introdotti duplicati. I dati dell'antibiogramma sono stati verificati con un sistema esperto che prevede l'eliminazione dei fenotipi improbabili o impossibili. Gli Stafilococchi coagulasi negativi sono stati considerati solo se isolati da emocolture ritenute significative perché ripetute.

Risultati

Lo studio ha riguardato 13.102 campioni biologici da cui sono stati isolati 2.278 ceppi batterici: la prevalenza dei microrganismi gram positivi è risultata essere del 59,3% e dei gram negativi del 40,7%.

Non sono mai stati isolati ceppi di *S.aureus* con sensibilità intermedia ai glicopeptidi, mentre alcuni ceppi di Stafilococco coagulasi negativo (*S.epidermidis* e *S.haemolyticus*) hanno mostrato sensibilità intermedia alla teicoplanina (da 86,2% a 88,8%).

Gli MRSA rappresentano l'88,4% degli *S.aureus* della UTI, il 72,5% del CTF, il 78,7% della CDU, il 62% dell'Ematologia. La meticillino-resistenza degli Stafilococchi coagulasi negativi è risultata compresa tra 74,6% dell'Ematologia e 96,6% del CTF.

In tutte le U.O. considerate si è osservata la circolazione di VRE ma non si è verificato alcun episodio epidemico.

Le maggiori resistenze sono state osservate, come previsto in UTI: la sensibilità alla ciprofloxacina di *E. coli* è del 38,2%, la sensibilità di *P.aeruginosa* all'imipenem 28,5%, e al ceftazidime 28,5%.

Nella U.O. di Ematologia la sensibilità di *P.aeruginosa* all'imipenem e al ceftazidime sono rispettivamente del 64% e del 24%.

Considerazioni

Come atteso le percentuali di resistenza in alcune U.O. sono molto elevate e da questo emerge l'importanza di un continuo e puntuale monitoraggio, nonché la necessità di sviluppare linee guida utili a contenere, sia con una maggiore razionalizzazione nell'uso degli antibiotici sia con azioni di natura comportamentale, le infezioni ospedaliere.

P083**RUOLO EZIOPATOGENETICO DEI MICOPLASMI UROGENITALI NELLE PROSTATITI CRONICHE**

*Restelli A., *Garlaschi C., *Colombo R., *Granata P., *Arcuri C., *Brighenti A., °Magri V., § Trinchieri A, *Scarazatti E.

*U.O Microbiologia A.O. Istituti Clinici di Perfezionamento Milano, °Ambulatorio Territoriale di Urologia ed Ecografia Urologica Istituti Clinici di Perfezionamento Milano, § A.O.A. Manzoni Lecco.

I micoplasmi vengono isolati con elevata frequenza dal tratto urogenitale e sono associati a diverse patologie negli adulti sessualmente attivi. *U. urealyticum* e *M. hominis* sono le specie più frequentemente isolate ma il tratto genito-urinario può essere colonizzato da altri micoplasmi quali *M. genital-*

ium, *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. spermatophilum*. Essendo microrganismi molto fragili, necessitano per la crescita di idonei substrati: *M. hominis* metabolizza l'argina producendo ammoniaca, *U. urealyticum* idrolizza l'urea: tali caratteristiche sono utilizzate per la loro identificazione. La prostatite cronica (PC) è una patologia urologica frequente ed ha un notevole impatto sulle condizioni di vita dei pazienti.

Per chiarire il ruolo eziologico dei micoplasmi urogenitali nella PC sono stati osservati nel periodo 2001-2003 n° 414 pazienti afferenti all'Ambulatorio di Urologia ed Ecografia Urologia della nostra Azienda: nel 27% dei casi (112 pazienti) sono stati rilevati uno o più agenti patogeni (PC batterica) mentre nel 73% (302 pazienti) non è stato rilevato alcun microrganismo (PC abatterica).

In tutti i pazienti è stato eseguito il Test di Meares e Stamey (four glass test) raccogliendo campioni di urina prima (V1 e VB2) e dopo massaggio prostatico (VB3) e quando possibile il secreto ottenuto dopo massaggio prostatico (EPS), inoltre è stato raccolto un campione di liquido seminale.

Il metodo da noi utilizzato è il test Mycofast Evolution 2 (DID) che permette la determinazione della carica, l'identificazione e la rilevazione della resistenza ad alcuni antibiotici.

I micoplasmi urogenitali sono stati isolati in 14 pazienti con una frequenza di isolamento del 12%: in 9 pazienti sono stati l'unico microrganismo isolato, in due casi sono stati ritrovati in associazione con *Gardnerella vaginalis*, mentre negli altri tre casi è stata riscontrata l'associazione rispettivamente con *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Morganella morganii*.

I dati ottenuti sono in accordo con quelli della letteratura: l'isolamento di micoplasmi urogenitali in campioni biologici significativi (EPS, VB3 e liquido seminale) in pazienti sintomatici con diagnosi clinico-ecografica di PC ci permette di supportare l'ipotesi di un loro coinvolgimento nell'eziopatogenesi di tale malattia.

P084

URINOCOLTURE COMUNITARIE: RAPPORTO QUALITÀ / COSTI GESTIONALI NELL'UTILIZZO DI TERRENI CROMOGENICI

Riva R., Carcheri M., Ciacci P., Graziani A., Lacitignola G., Ventura A., Capuzzo R..

Laboratorio Chimico Clinico e Microbiologico - Az. Ospedaliera "Villa Scassi" - Genova - Primario Dr. Capuzzo Roberto

Obiettivi

L'aumento dei costi nelle strutture ospedaliere porta a diminuire le spese ed il personale. Un settore interessato è quello diagnostico, ove si riduce l'intervento umano tramite automazione sempre più spinta ed aumento dei carichi di lavoro.

Metodi

L'infezione delle vie urinarie è una delle patologie più diffuse a livello comunitario, l'urinocoltura è percentualmente l'esame più richiesto al Laboratorio di Batteriologia. In commercio sono presenti terreni contenenti sostanze cromogene che permettono lo sviluppo di microrganismi differenziabili per diverso colore e morfologia.

Pensiamo che laddove si possano sacrificare i dati epidemiologici, ad esempio negli isolamenti da urinocolture comunitarie, possa essere economicamente vantaggioso l'utilizzo di terreni cromogenici che permettano un'identificazione sufficientemente certa tale da permettere l'esecuzione del solo Antibiotogramma.

Risultati

Abbiamo analizzato i nostri risultati relativi ad un anno di urinocolture comunitarie, pari a 1890, delle quali 425 positive. Per 366 di queste poteva essere accettata l'identificazione da terreno cromogenico (*E. coli*, *P. mirabilis*, *E. faecalis*, *S. agalactiae*, *P. aeruginosa*), per le rimanenti 59 occorreva procedere ad identificazione.

Abbiamo comparato le possibilità offerte da tre società produttrici di terreni di coltura presenti sul territorio nazionale (Becton Dickinson, Biolife, bioMérieux) che producono terreni cromogenici per urinocolture. Abbiamo confrontato il costo globale di un'esecuzione tradizionale con isolamento su CLED + Agar Sangue e successiva identificazione per tutti gli isolati, confrontandolo con il costo di utilizzo di terreni cromogenici in sostituzione del CLED; laddove presenti abbiamo ipotizzato l'impiego di piastre a due terreni.

Poiché solo due delle società indicate possiedono sistemi di Identificazione ed Antibiotogramma (praticamente coprono quasi tutto il mercato nazionale) per la terza (Biolife) abbiamo effettuato un doppio confronto con entrambi i sistemi identificativi.

Ci siamo attenuti strettamente ai prezzi di listino.

Conclusioni

Impiegando terreni cromogenici e procedendo all'identificazione solo per gli isolati non identificabili direttamente, il risparmio che può raggiungere il 47%.

P085

INFEZIONI DA *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* IN ASMA BRONCHIALE: DIAGNOSI DI LABORATORIO E IMPLICAZIONI CLINICHE.

Roschetto E., Piccoli S., Avagliano G., Tamburro F.*, Lambiase A. e Grisolia V.

Area Funzionale di Diagnostica Microbiologica -

Dipartimento di Patologia Clinica

Università degli Studi di Napoli Federico II

*Azienda Ospedaliera Santobono-Pausilipon

C. pneumoniae è correlata alla patogenesi dell'asma bronchiale attraverso un meccanismo diretto mediato dall'inibizione delle ciglia dell'epitelio bronchiale e da uno indiretto tramite stimolazione di linfociti Th2 e interferone gamma. Inoltre, la presenza del patogeno nelle cellule dell'albero bronchiale favorirebbe la bronco-costrizione.

Nel nostro studio sono stati esaminati campioni di sieri provenienti da pazienti in età pediatrica (2-15 anni) con infezioni delle alte e basse vie respiratorie. Il 30% di essi presentava titolo elevato di anticorpi IgM contro *C. pneumoniae* rilevati con le comuni metodologie (ELISA e MIF) accettate per la diagnosi di infezione.

L'80% dei pazienti IgM+ aveva una storia clinica di infezioni respiratorie ricorrenti, con episodi di dispnea con i caratteri dell'asma trattati con corticosteroidi per via inalatoria. Di particolare interesse l'osservazione che fratelli di età diversa, che avevano utilizzato il medesimo apparecchio per terapia inalatoria, avevano sviluppato sintomi respiratori ricorrenti, verosimilmente da riferire a infezione da *C. pneumoniae*.

I pazienti IgM+ sono stati trattati con cicli di antibiototerapia a base di macrolidi (roxitromicina), una classe di antibiotici ad elevato potere antimicrobico e ad azione antinfiammatoria, mediata dalla riduzione della trascrizione di mRNA di una varietà di citochine e dall'inibizione del rila-

scio di interleukina-8 da parte degli eosinofili. I parametri considerati ai fini della valutazione dei risultati dello studio sono : 1) sintomatologia clinica; 2) frequenza delle recidive ; 3) risparmio di corticosteroidi. Indicazioni preliminari da noi ottenute consentono di prospettare un ruolo di rilievo della terapia antibiotica con macrolidi nel controllo della sintomatologia respiratoria nelle riacutizzazioni asmatiche associate all'infezione da *C. pneumoniae*.

P086

INFEZIONI DA MYCOPLASMI UROGENITALI IN PAZIENTI CON ANAMNESI POSITIVA PER POLIABORTIVITÀ.

Sanvitale N., Ruffini I., Tucci E., Carosella R.,

ASL - Chieti. Ospedale G. Bernabeo. Ortona

Introduzione

Tra tutte le specie di Mycoplasmi noti, il *Mycoplasma hominis*, ed *Ureoplasma urealyticum* sono responsabili di patologie urogenitali (uretriti, vaginiti, salpingiti, cerviciti, infertilità, poliabortività) ed ostetriche (endometriti post-partum, infezioni neonatali).

Con il presente studio abbiamo voluto valutare la frequenza di isolamento di *M. Hominis* e *U. urealyticum* in un gruppo di pazienti in età fertile arruolate per poliabortività.

Materiali e metodi

Abbiamo analizzato 70 tamponi cervicali eseguiti mediante raschiamento della mucosa cervicale al fine di raccogliere le cellule alle quali aderiscono i Mycopasmi, in donne in gravidanza con anamnesi positiva per poliabortività. La metodica utilizzata per valutare la presenza di *U. urealyticum* e *M. Hominis* è il "MYCOPLASMA DUO" della ditta BIORAD che permette la coltura, titolazione ed identificazione differenziale dei Mycoplasmi urogenitali.

Risultati e conclusioni

Dei 70 campioni esaminati, 20 sono risultati positivi (19 positivi per *U. urealyticum*, ed 1 positivo per *M. hominis*) Tab.1 con una sensibilità pari al 100% per: doxyciclina, pristinamicina, minociclina, fra tutti gli antibiotici testati.

TABELLA 1.

N. campioni esaminati	Positivi	Negativi
70	20	50
%	28,57%	71,43

I risultati del presente studio mostrano che la frequenza di tali infezioni è del 28,57 %, tale da giustificare a nostro parere, che la ricerca dei Mycoplasmi, sia inserita nei protocolli di studio di donne in gravidanza ed anamnesi positiva per poliabortività, al fine di evitare terapie inefficaci ed inadeguate per patologie urogenitali e/o ostetriche associate alla presenza di tali microrganismi.

BIBLIOGRAFIA

1. Arya O.P., Tong C.Y.W. et all.
Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen?
Sex. Trasm. Inf. 77, 58-62, 2001.

P087

CIRCOLAZIONE DI *ACINETOBACTER BAUMANII* TRA DIVERSI REPARTI PER ACUTI: UN ESEMPIO DI TRACCIABILITA' DI CEPPI NOSOCOMIALI MEDIANTE RIBOTIPIZZAZIONE.

Sarnelli B., *Fossati L., *Bonfitto M.G., *Catalano A., Abate R., Morelli M.L., Ingala F.

*Struttura Complessa di Microbiologia - A. O.

S. Giovanni Battista - C.so Bramante 88 - Torino

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

Scopi. Valutare mediante ribotipizzazione il possibile ruolo dei portatori nella trasmissione di *Acinetobacter baumannii* tra soggetti ospedalizzati. La nostra osservazione delle espressioni resistotipiche nell'ultimo biennio, aveva evidenziato la sovrapposibilità tra numerosi isolamenti effettuati da pazienti ricoverati in Terapia Intensiva ed altri, avvenuti ultimamente, in Reparti chirurgici. I pattern di restrizione ottenuti da alcuni di tali isolamenti hanno evidenziato un tipico evento di infezione nosocomiale, inizialmente sostenuta probabilmente da un ceppo ambientale di *A. baumannii* endemico, la cui trasmissione a pazienti immunocompromessi di reparti diversi potrebbe essere stata mediata da operatori sanitari.

Materiali e metodi. Sono stati presi in considerazione 4 isolamenti di *A. baumannii* effettuati nello stesso periodo: due ottenuti da broncoaspirato e da catetere vescicale di un paziente politraumatizzato ricoverato in Terapia intensiva, divenuto poi setticemico, denominati rispettivamente ceppi 2 e 3; uno ottenuto dal broncoaspirato di un paziente ricoverato in Chirurgia Toracica, denominato ceppo 4, ed infine un isolamento ambientale effettuato da componenti dell'impianto di condizionamento della stessa Terapia intensiva, denominato ceppo 1.

I ceppi presi in considerazione avevano mostrato profili di chemiosensibilità del tutto identici rispetto agli antibiotici contenuti nelle gallerie *ATB G-* e *ATB PSE®* Biomerieux; tutte le resistenze sono state confermate con il metodo di diffusione in agar secondo Kirby-Bauer. Le MIC di Imipenem, Meropenem, Amikacina e Colistina, verso cui i 4 ceppi non mostravano resistenza con i precedenti metodi, sono state definite con il metodo di gradiente di diffusione in agar ETEST® Bioline: da tutti i ceppi, utilizzando inoculi pari a 0.5 McFarland ottenuti da colture di 24h, sono stati allestiti gli ETEST su Agar Mueller Hinton, incubando per 24 h a 37°C.

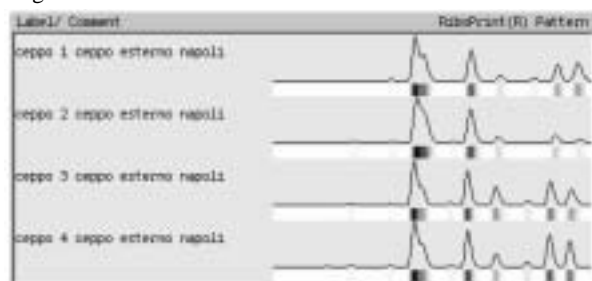
La ribotipizzazione è stata eseguita utilizzando il sistema automatizzato RiboPrinter®. L'enzima di restrizione adoperato, EcoRI, è in grado di rivelare i polimorfismi nelle regioni cromosomiche di DNA che contengono i geni dell'rRNA ribosomiale: tali polimorfismi sono rivelati utilizzando sonde marcate che contengono le sequenze 16S e 23S di *E. coli*.

Risultati. La fig. 1 descrive i ribogruppi dei 4 ceppi presi in considerazione: i ceppi 3 e 4, provenienti rispettivamente dal catetere vescicale di un degente in Terapia intensiva e dal broncoaspirato di un degente in Chirurgia, sono strettamente correlati in quanto mostrano lo stesso ribogruppo. Il ceppo 2, da broncoaspirato dello stesso paziente di T.I., ha un pattern completamente diverso. Infine il ceppo 1, isolato da un impianto della T.I., ha un profilo strettamente correlato ai ceppi 3 e 4.

Conclusioni. L'indagine biomolecolare si dimostra particolarmente utile nel descrivere la circolazione di particolari ceppi e, nel nostro caso, permette di ipotizzarne anche le

modalità di diffusione: un ceppo ambientale può aver dato origine ad un altro responsabile di un evento infettivo in T.I. (ceppi 1 e 3). Un ceppo identico al n.3 (ceppo 4) compare dopo pochi giorni in Chirurgia: tali risultati, insieme alle altre informazioni raccolte in questo caso, sembrano indicare che la trasmissione mediata da operatori sanitari del ceppo 3 da un reparto all'altro sia un evento quanto meno possibile.

Fig. 1



P088

CHEMIOSENSIBILITA' DI *ACINETOBACTER BAUMANII* RESPONSABILI DI EPISODI EPIDEMICI IN REPARTI DI TERAPIA INTENSIVA.

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

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

Introduzione. La frequente circolazione di *Acinetobacter baumannii* nei reparti di Terapia intensiva è ampiamente documentata da molteplici e diffuse evidenze che hanno dimostrato il ruolo di tale patogeno, tipicamente a circolazione nosocomiale, nel determinare un elevato tasso di mortalità in tali eventi morbosi, dovuto al sempre più frequente riscontro di ceppi multiresistenti.

Obiettivi. La nostra esperienza, nel corso del biennio 2002-2003, è caratterizzata dal riscontro nei degenti in Terapia intensiva di eventi infettivi sostenuti da *A. baumannii*, sia sporadici che tipicamente epidemici, in cui si ripresentavano costantemente particolari profili di resistenza, sostanzialmente invariabili, alla maggior parte dei chemioterapici saggiati. Analoghe espressioni resistotipiche sono state riscontrate in isolamenti ambientali effettuati negli stessi reparti. È apparso, pertanto, utile il loro confronto relativo alle MIC delle poche molecole verso cui essi non mostravano resistenza, anche al fine di valutare una eventuale omogeneità dell'espressione fenotipica che avvalorasse o meno l'ipotesi della circolazione solo di pochi ceppi, se non di un unico ceppo, ipotesi da verificare con metodi biomolecolari.

Materiali e metodi. Sono stati presi in considerazione 56 isolamenti di *A. baumannii* da 36 degenti in Terapia intensiva nel biennio 2002-2003, tutti identificati con il sistema Id 32 GN® Biomerieux. I campioni di provenienza umana erano: 9 emocolture, 11 urine, 10 cateteri vescicali, 3 cateteri venosi, 14 broncoaspirati, 5 liquidi pleurici e 3 liquidi peritoneali. Gli isolamenti ambientali di *A. baumannii* erano in tutto 5, provenienti da superfici di lavoro o da impianti di condizionamento.

Dopo uno screening iniziale, effettuato saggiando la sensibilità ai diversi antibiotici contenuti nelle gallerie ATB G- e ATB PSE® Biomerieux, i ceppi non sensibili sono stati rivalutati con metodo di diffusione in agar secondo Kirby-Bauer. Le MIC di Imipenem, Meropenem, Amikacina e Colistina,

verso cui la maggior parte dei ceppi non mostravano resistenza con i metodi di screening, sono state definite con metodo di gradiente di diffusione in agar ETEST® Biolife: da tutti i ceppi, utilizzando inoculi pari a 0.5 McFarland ottenuti da colture di 24h, sono stati allestiti gli Etest su Agar Mueller Hinton, incubando per 24 h a 37°C.

Risultati. Le tabelle 1 e 2 riassumono rispettivamente i risultati ottenuti per le principali classi di antibiotici (tab.1) e per le MIC di Imipenem, Meropenem, Amikacina e Colistina ottenute con l'Etest (tab.2).

Conclusioni. Risulta ben evidenziato l'aspetto epidemiologico rappresentato dalla costante colonizzazione ambientale e umana dei reparti di Terapia intensiva da parte di ceppi nosocomiali multiresistenti di *A. baumannii* (derivanti dai ben noti fattori di selezione). Le basse misure di dispersione nella distribuzione delle MIC di Carbapenemi, Amikacina e Colistina riscontrate nei nostri isolamenti, evidenziano un'elevata omogeneità di risposta. La stessa sostanziale sovrapposibilità dell'espressione fenotipica ottenuta nei diversi isolamenti, tale da proporre l'ipotesi dell'endemicità di pochi ceppi, ci ha suggerito la necessità di approfondire l'aspetto biomolecolare in un ulteriore studio, tuttora in corso.

Tabella 1

	Sensibili n. (%)	Intermedi n. (%)	Resistenti n. (%)
Amoxicillina	0 (0%)	1 (1.8%)	55 (98.2%)
Amoxicillina ac. Clav.	0 (0%)	1 (1.8%)	55 (98.2%)
Piperacillina	1 (1.8%)	2 (3.6%)	53 (94.6%)
Piperacillina Tazobac.	2 (3.6%)	4 (7.1%)	50 (89.3%)
Ticarcillina	0 (0%)	1 (1.8%)	55 (98.2%)
Ticarcillina ac. Clav.	0 (0%)	1 (1.8%)	55 (98.2%)
Cefalotina	0 (0%)	0 (0%)	56 (100%)
Cefoxitina	0 (0%)	0 (0%)	56 (100%)
Cefotaxime	1 (1.8%)	1 (1.8%)	54 (96.4%)
Cefepime	0 (0%)	0 (0%)	56 (100%)
Cefuroxime	0 (0%)	0 (0%)	56 (100%)
Ceftazidime	2 (3.6%)	5 (8.9%)	49 (87.5%)
Tobramicina	2 (3.6%)	2 (3.6%)	52 (92.8%)
Amikacina	49 (87.5%)	5 (8.9%)	2 (3.6%)
Gentamicina	2 (3.6%)	2 (3.6%)	52 (92.8%)
Netilmicina	2 (3.6%)	4 (7.1%)	50 (89.3%)
Ciprofloxacina	4 (7.1%)	7 (12.5%)	45 (80.4%)
Cotrimossazolo	0 (0%)	2 (3.6%)	54 (96.4%)
Imipenem	4 (7.1%)	33 (59%)	19 (33.9%)
Meropenem	3 (5.4%)	35 (62.5%)	18 (32.1%)
Colistina	56 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Ampicillina Sulbact.	2 (3.6%)	23 (41.1%)	31 (55.3%)

Tabella 2

	Media (mg/l)	Deviazione standard	C.V. (%)
MIC Imipenem	7.3	0.42	5.75
MIC Meropenem	6.2	0.33	5.32
MIC Amikacina	8.1	0.27	3.33
MIC Colistina	0.95	0.09	9.16

P089

"BATTERI SENTINELLA" IN AMBITO OSPEDALIERO

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

Laboratorio Microbiologia Azienda Policlinico
Università degli studi di Catania

La sorveglianza delle infezioni nosocomiali è riconosciuta, da parte di tutti gli operatori come una componente fondamentale dei programmi di controllo ospedalieri. Si discute però sulle modalità di questo controllo, gli strumenti da utilizzare e gli eventi da monitorare. In altre nazioni si mette in atto una sorveglianza che permette di rilevare i *microrganismi sentinella* che sono in grado di diffondersi rapidamente in ospedale se non controllati adeguatamente.

Il laboratorio è una fonte sicura ed economica per identificare questi organismi.

Il sistema informatico epicenter Becton Dickinson applicato al Phoenix prevede, con grande facilità, di rilevare e monitorare nel tempo la presenza di *patogeni sentinella*. Il sistema è stato utilizzato nel nostro laboratorio dove affluiscono i campioni dei reparti di pediatria, chirurgia, neurologia, terapia intensiva, terapia intensiva neonatale, day-hospital e ambulatoriali esterni da gennaio 2002 a gennaio 2004.

I batteri sentinella sono: *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Stafilococchi* meticillina resistenti, *Enterococchi* vancomicina resistenti e Gram negativi con EBSL.

Su 1025 batteri isolati sono stati riscontrati 212 organismi sentinella:

S. marcescens 8 (3,7%), *E. aerogenes* 3 (1,4%), *E. cloacae* 6 (2,8%), *K. oxytoca* 3 (1,4%), *E. coli* 28 (13,2%), *K. pneumoniae* 25 (11,7%), *P. aeruginosa* 27 (12,7%), *S. epidermidis* 52 (24,5%), *S. capitis* 10 (4,7%), *S. hominis* 6 (2,8%), *S. warneri* 3 (1,4%), *S. aureus* 3 (1,4%), *S. haemolyticus* 11 (5,1%), *E. faecalis* 9 (4,2%), *E. faecium* 2 (0,9%).

I batteri sentinella sono stati riscontrati sia nei reparti con pazienti a rischio (terapia intensiva trapianti, ematologia, neonatologia) sia nei reparti di day hospital e ambulatoriali esterni. Questo dato evidenzia come la farmaco resistenza non è solo un problema di pertinenza ospedaliera ma è diffuso anche nei pazienti ambulatoriali. Il supporto informatico, con la possibilità di disporre dei dati in tempo reale, viene oggi in aiuto al laboratorio di microbiologia. Si ha infatti la possibilità di avere dati aggiornati sulle resistenze batteriche, sui patogeni nosocomiali resistenti, sulla prevalenza di un patogeno opportunista in un reparto. Di conseguenza è più facile la predisposizione di piani di controllo e sorveglianza delle infezioni.

P090

DIFFUSIONE DI *S. PNEUMONIAE* TRA BAMBINI DEGLI ASILI NIDO

Grassi P., Grasso E., Sciacca A., Trapanotto G*, Cuccia M., Lo Grande S*, Sorge G*.

*Usl 3 Catania Servizio di epidemiologia,

*Clinica Pediatrica Azienda Policlinico,

Laboratorio microbiologia Azienda Policlinico

*Università degli studi di Catania

S. pneumoniae è da sempre, specie in età pediatrica, consi-

derato agente etiologico di sinusiti, otiti medie, meningiti, e benché l'incidenza sia diminuita, rimane l'agente causale delle polmoniti in particolare di quelle acquisite in comunità. Inoltre il *S. pneumoniae* può far parte della flora saprofita del cavo oro-faringeo in individui sani con percentuali che possono raggiungere anche il 70%. Non sono stati ancora chiariti i meccanismi che portano a interrompere lo stato di commensale per sfociare nelle patologie suddette. L'invasività è dovuta alla capsula che svolge un effetto antifagocitario, è necessario quindi che l'ospite abbia una risposta immune adeguata con anticorpi altamente protettivi tipo specifici, T-indipendenti, opsonizzanti. In questi ultimi anni alla patogenicità del batterio si è associata una multiresistenza nei confronti degli antibiotici comunemente usati quali penicilline, macrolidi, cefalosporine, cotrimoxazolo.

Abbiamo voluto individuare, prima di una campagna vaccinale, la prevalenza dei portatori in una popolazione pediatrica ed evidenziarne la sensibilità dei ceppi isolati.

Hanno preso parte allo studio 153 bambini provenienti da asili nido, l'età era compresa da 3 mesi a 36 mesi. Ad ognuno è stata effettuata un'anamnesi e una visita medica accurata.

Il prelievo rino-faringeo è stato eseguito mediante tampone con anima metallica piegato a 45° gradi. Il tampone veniva strisciato immediatamente su piastra di agar triptosio con 5% di sangue, inviato in laboratorio e incubato in termostato a 37°C.

Sulle colonie sospette è stata valutata la sensibilità all'optochina. L'identificazione è stata confermata col sistema automatico Vitek. La percentuale di bambini portatori è stata del 17,4% nel 2003 e del 30% nel 2004.

Abbiamo saggiato, con metodo di Kirby Bauer su piastre di Muller Hinton con 5% di sangue di montone, la sensibilità alla amoxicillina, oxacillina, ciprofloxacina, levofloxacina, cefotaxime, ceftriaxone. Tutti i 18 ceppi di *S. pneumoniae* sono risultati sensibili agli antibiotici saggiati.

La percentuale di positività riscontrata in questo studio giustifica la campagna vaccinale eseguita nei bambini in questa fascia di età, in cui l'imaturità del sistema immunitario, li rende soggetti a infezioni delle vie respiratorie sostenute da questi germi.

La resistenza agli antibiotici riportata da più AA non è stata riscontrata nei 18 stipiti di *S. pneumoniae* isolati dai tamponi rino-faringei del nostro studio.

P091

APPLICAZIONE DI UNO STANDARD QUALITATIVO MINIMO PER IL TRATTAMENTO DELLE BATTERIEMIE

Minniti D., Arione R., Guglielmi E., Serra R. (*), Marchiaro G. (*)

Direzione Sanitaria ASO S. Giovanni Battista di Torino - Torino

(*) SCDO Microbiologia ASO S. Giovanni Battista di Torino - Torino

La sepsi costituisce un evento di per sé grave e un trattamento adeguato può ridurre fino a tre volte la mortalità associata (dal 24% al 7%). La terapia antibiotica è in realtà inappropriata nel 5%-17% dei casi. La Infectious Diseases Society of America (IDSA) raccomanda che il trattamento della sepsi sia, ove possibile, sempre guidato dai risultati degli esami colturali e propone uno standard minimale, per valutare la qualità del trattamento stesso; tale standard, facilmente verificabile, prevede che l'antibiotico somministrato al paziente sia compatibile con i risultati dell'antibiogramma, almeno a partire dalle prime 24 ore dopo che è disponibile il referto microbiologico(1).

Lo standard è stato adottato anche dalla nostra Azienda, nell'ambito degli obiettivi assegnati per la qualità dell'assistenza nel corso del 2003. Nel febbraio del 2004 si è proceduto a una verifica random attraverso l'esame retrospettivo di 97 cartelle di pazienti con batteriemia documentata dalla positività dell'emocultura, ricoverati in reparti di medicina: i requisiti dello standard sono stati ritenuti soddisfatti se la terapia del paziente, a distanza di non oltre 48 ore dalla data di stampa del referto, contemplava almeno un antibiotico cui il ceppo isolato dall'emocultura risultava sensibile.

In 18 casi non è stato possibile verificare la compatibilità con lo standard in quanto il paziente risulta deceduto (il che dimostra ulteriormente l'elevata mortalità associata alla sepsi), dimesso o trasferito ad altra unità prima della disponibilità dei risultati dell'emocultura; la terapia è risultata adeguata in 72 casi (91.1%), inadeguata in 7 casi (8.9%).

L'analisi preliminare dei risultati ha dimostrato tuttavia che, nei casi in cui la terapia risulta adeguata, il trattamento è stato iniziato su base empirica utilizzando antibiotici ad ampio spettro o associazioni di antibiotici e che per lo più non è stata attuata alcuna forma di "deescalation therapy", una volta noti i risultati dell'antibiogramma. I casi di inadeguatezza del trattamento invece, sono verosimilmente da attribuire a una lettura errata dell'antibiogramma, che rivela una scarsa conoscenza dei meccanismi della resistenza batterica: infatti l'antibiotico utilizzato in modo improprio (per lo più cefalosporine di 3^a generazione nei confronti di batteriemi sostenute da enterococchi) non risulta saggiato nell'antibiogramma, in quanto il ceppo è considerato naturalmente resistente ad esso.

BIBLIOGRAFIA

1. Gross PA, Barrett TL, Dellinger E, Krause PJ, Martone WJ, McGowan JE, Sweet RL, Wenzel RP. Quality standard for the treatment of bacteremia. Clin Infect Dis, 1994 18: 428-30

P092

MENINGITE DA *STREPTOCOCCUS PYOGENES* COMPLICATA DA RABDOMIOLISI

Spinelli M., Mauri R.*, Longoni E.*, Sala E., Cattaneo D., Santoro D.*, Giana G.

Laboratorio di Patologia Clinica, *U.O. Malattie Infettive, Ospedale Sant'Anna - COMO.

Introduzione

S.pyogenes, agente eziologico di faringotonsilliti, può originare complicanze sistemiche quali polmoniti, sepsi e meningiti. La rabdomiolisi è caratterizzata da elevati livelli sierici di CPK, da danno dei muscoli scheletrici: è complicanza di un ampio spettro di malattie correlate o meno ad infezioni, più frequentemente respiratorie ed urinarie; i batteri gram negativi sono più spesso rappresentati. Viene riportato il caso di un uomo di 63 anni affetto da meningite da *S. pyogenes*, complicata da rabdomiolisi acuta, ricoverato in Malattie Infettive.

Metodi

Il paziente perveniva al Pronto Soccorso in stato di incoscienza dopo caduta al domicilio: riferita nei giorni precedenti la comparsa di otalgia destra con fuoriuscita di materiale sieroso e successiva insorgenza di febbre e cefalea; sottoposto a puntura lombare con fuoriuscita di liquor torbido, veniva ricoverato in Malattie Infettive e iniziata terapia con ceftriaxone ed ampicillina.

Risultati

Esame chimico-fisico del liquor: aspetto torbido, colore xantocromico, protidorrachia 935 mg/dL, glicorrachia 1 mg/dL; 4700 leucociti/mm³; cocchi gram positivi al batterioscopico.

TAC delle rocche petrose: opacamente massivo orecchio medio e mastoide destra, possibile presenza di materiale purulento. Successivo isolamento da liquor e sangue di *S. pyogenes*. Esami ematochimici: incremento creatinemia e transaminasi con CPK che, nel volgere di 5 giorni, passava da 1046 UI/L a 33349 UI/L. Normali CK-MB massa e troponina T, importante aumento di mioglobina, fino a 4660 ng/mL e di mioglobinuria, fino a 93.500 ng/mL. Intrapresa terapia infusoriale con diminuzione dei valori di mioglobina fino a normalizzazione. Un controllo del liquor a distanza di due settimane evidenziava ancora aumento dei polimorfonucleati con normalizzazione di glucosio e proteine ed aspetto limpido.

Conclusioni

Il paziente giunto alla nostra osservazione per meningite acuta ha evidenziato una complicanza non frequente ma il cui pronto riconoscimento è importante al fine di evitare gravi e potenzialmente letali complicanze: tuttora degente, il decorso clinico è favorevole.

P093

RIVELAZIONE DI CEPPI MULTIRESISTENTI DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* DT104 E FAGOTIPI CORRELATI BASATA SULL'USO DI UN SAGGIO DI PCR MULTIPLEX

Staffolani M., Fisichella S., Blasi G*, Briscolini S*.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche Sezione di Macerata, Centro di Riferimento Regionale per gli Enteropatogeni; Via dei Velini 15, 62100 Macerata

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche Sezione di Fermo; C.da S. Martino 6/a 63023 Fermo

Le infezioni causate da *Salmonella* continuano ad aumentare sia in campo veterinario che in campo umano in tutto il mondo.

In particolare *S. Typhimurium* fagotipo DT104 da circa un decennio sta ponendo un grave problema di sanità pubblica a causa dell'acquisizione di resistenza multipla agli antibiotici. Test rapidi per la rivelazione dei ceppi multiresistenti di *S. Typhimurium* DT104, potrebbero essere utili per approfondire la conoscenza e l'epidemiologia dei geni di resistenza antibiotica.

In questo lavoro è stato valutato un saggio di PCR multiplex (PCRm) che amplifica un segmento di DNA specifico e conservato nei ceppi multiresistenti di *S. Typhimurium* DT104 con il profilo di resistenza antibiotica ACSSuT/ASSuT. Alcuni fagotipi probabilmente derivati da DT104 (U302, DT12 e DT120) con lo stesso profilo di resistenza antibiotica, sono rivelabili dallo stesso saggio di PCRm.

Per valutare la specificità del saggio sono stati analizzati mediante PCRm e sottoposti ad antibiogramma 77 ceppi di *Salmonella* di varia origine isolati nella regione Marche dal 1997 al 2003. Per tutti i ceppi di *Salmonella* appartenenti ai sierotipi *Typhimurium* ed *Enteritidis* è stato determinato anche il fagotipo.

I risultati dimostrano che il saggio in questione può essere considerato un metodo valido e ripetibile per la rivelazione dei ceppi di *S. Typhimurium* multiresistenti o di altri fagotipi che potenzialmente potrebbero diventare tali in seguito all'acquisizione del segmento genico in questione. Infine occorre sottolineare che il saggio di PCRm è in grado in circa 5 ore di fornire lo stesso risultato che attualmente è ottenuto in media in 4 giorni, tempo necessario per l'esecuzione dell'antibiogramma e della fagotipizzazione.

In ogni caso il saggio di PCRm si rivela fondamentale per studiare la mobilità e monitorare la diffusione del pacchetto

genico costituito dai due integroni adiacenti contenente i 5 geni di resistenza.

P094

CIRCOLAZIONE ENDEMICA DI ENTEROCOCCO RESISTENTE ALLA VANCOMICINA IN UNA GRANDE AZIENDA OSPEDALIERA

Stampone L. *, Parisi G. **, Del Grosso M. *, Valmarin M. **, Zaccaro C. **, Pinzi M. **, Minniti R. **, Tronci M. **, Pantosti A. *, Sodano L. **

* Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed

Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità,

** Azienda Ospedaliera "San Camillo-Forlanini", Roma.

Obiettivi: quantificare e qualificare la circolazione di enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) in un'azienda ospedaliera con circa 1.500 posti-letto.

Metodologia: dal gennaio 2002 al maggio 2003 è stata condotta la ricerca attiva di VRE con coprocultura nei pazienti ricoverati nelle stesse stanze dei pazienti colonizzati/infetti da VRE. Sugli isolati sono stati eseguiti l'identificazione di specie e lo studio del genotipo di resistenza alla vancomicina mediante PCR. Su un campione di VRE è stata effettuata la tipizzazione molecolare mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE).

Risultati: nel periodo in esame sono stati identificati 88 pazienti colonizzati/infetti da VRE, di cui 75 (85,2%) da *E. faecium* e 13 (14,8%) da *E. faecalis*, con un trend in aumento nel tempo: per *E. faecium* si è passati da 25 pazienti del 2002 a 50 dei primi 5 mesi (mm) del 2003 e per *E. faecalis* da 4 a 9. L'incremento si conferma, escludendo i pazienti colonizzati a livello enterico. Le batteriemie da VRE sono state 2 nel 2002 (6,9%) e 4 (6,8%) nei primi 5 mm del 2003. In 80 ceppi isolati da 63 pazienti è stato identificato il gene *vanA* di resistenza ai glicopeptidi. I ceppi VRE *E. faecium* hanno mostrato un profilo elettroforetico simile, corrispondente ad uno stesso clone (pulsotipo A); all'interno di questo si possono distinguere vari subcloni (pulsotipi da A1 ad A13). Il pulsotipo A1, già riscontrato nel 2001, è presente in reparti diversi ed è stato rilevato anche in un paziente ambulatoriale. Il clone VRE endemico è resistente agli aminoglicosidi e possiede il gene *esp*, considerato marker di diffusività nosocomiale.

Conclusioni: la tipizzazione molecolare suggerisce la circolazione endemica di un clone di VRE *E. faecium* comprendente diversi subcloni. Sono ipotizzabili importazioni dall'esterno e trasmissioni crociate ospedaliere. Al fine di valutare i diversi contributi, nosocomiali e non, è necessario un approfondimento.

P095

STUDIO DELLA EZIOLOGIA BATTERICA E DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA DELLE POLMONITI OSPEDALIERE IN TERAPIA INTENSIVA

Miragliotta G., Mosca A., Pizzolante M. *, Rizzo A. *, Faneschi M.L. *, Sticchi Damiani A. *

Sezione di Microbiologia, Dip. MIDIM, Università degli Studi, P.zza G. Cesare, 70124 Bari,

*Laboratorio di Microbiologia A.S.L. LE/I - Presidio Ospedaliero "Vito Fazzi", Piazza F. Muratore, 73100 Lecce

Scopo: Il laboratorio di microbiologia ha assunto un ruolo determinante nella sorveglianza e nel controllo delle infezio-

ni nosocomiali a causa del crescente aumento della loro incidenza e della loro gravità. Nel presente studio abbiamo valutato la frequenza di isolamenti dei microrganismi responsabili di polmonite in pazienti ricoverati presso reparti di terapia intensiva e il loro pattern di antibiotico resistenza.

Materiali e metodi: Nel periodo 01/01/03 - 30/06/03 nel Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale "Vito Fazzi" di Lecce sono stati valutati 299 campioni respiratori positivi (secreto bronchiale, BAL, espettorato) provenienti dai reparti di Neurochirurgia e Rianimazione. I campioni sono stati validati con l'esame microscopico e sottoposti ad esame colturale per la valutazione della carica batterica e l'identificazione. Sono stati utilizzati i terreni MacConkey, Sabouraud, agar sangue e Chapman-Stone, incubati a 37°C over night. Il sistema automatico VITEK 2 (bioMérieux) è stato utilizzato per l'identificazione e l'antibiogramma.

Risultati e conclusioni: I microrganismi isolati con maggior frequenza sono stati *Ps. aeruginosa* (30.1%), *S. aureus* (28%) e *A. baumannii* (11.7%). Degli enterobatteri, *K. pneumoniae* è stata la specie maggiormente isolata (9%) insieme a *S. marcescens* (6.3%). Per quanto riguarda la resistenza antibiotica, *P. aeruginosa* è risultata resistente a imipenem (67%), cefepime (45%), ceftazidime (76%), tobramicina (84%), ciprofloxacina (86%) e piperacillina/tazobactam (25%). Il 70% dei ceppi di *S. aureus* è risultato resistente alla meticillina. Il 70% dei ceppi di *K. pneumoniae* è risultato resistente alle cefalosporine ad ampio spettro e al cefepime. *A. baumannii* ha esibito resistenza nei confronti di imipenem (12%).

P096

UTILITA' DEL PAR-TEST NELL'INTERPRETAZIONE DELL'URINOCOLTURA

Del Gaudio T., D'Alagni M., Porzio M., Ricciardi E., Tarricone N., Mosca A. *, Miragliotta G. *

Laboratorio Analisi P.O. Di Andria AUSL BA/I

*Sezione Microbiologia, Dipartimento MIDIM, Università Di Bari.

La determinazione del Potere Antibatterico Residuo (PAR-test) nelle urine consente di evitare di definire "negativi" campioni con carica batterica bassa a causa della presenza di sostanze con attività antimicrobica. Tali sostanze sono solitamente chemioterapici dei quali il rene è il principale organo emuntore. Al fine di valutare la reale incidenza di questo fenomeno nella nostra area operativa (Ospedale Civile di Andria, in-patients e out-patients) abbiamo eseguito il PAR-test su 25.832 di 31.168 campioni urinari sottoposti ad esame colturale nel periodo Gennaio 1994-Dicembre 2003. È stato utilizzato il metodo di diffusione su piastre di agar inoculate con una quantità standardizzata di spore di *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, microrganismo sensibile a tutti gli antibiotici conosciuti ed in grado di svilupparsi a temperatura elevata. Con tale metodica, un dischetto di carta da filtro del diametro di 6 mm., imbevuto per capillarità con urina, viene posto sulla superficie dell'agar che viene quindi incubato a 60 °C per favorire le sporulazione di *B. stearothermophilus*. L'eventuale presenza di sostanze antibatteriche si manifesta con un alone di inibizione della crescita batterica. I risultati ottenuti sono illustrati nella tabella 1.

I risultati da noi ottenuti dimostrano la portata della problematica connessa alla presenza di sostanze antibatteriche nelle urine dei soggetti esaminati. In particolare nei pazienti ospedalizzati si riscontra elevata percentuale di urine positive al PAR-test (20,5%), verosimilmente da rapportarsi a pregressa terapia domiciliare. L'interpretazione dell'esame colturale di questi campioni sarebbe difficile in assenza del PAR-test in

quanto verrebbero sottovalutate le cariche batteriche basse, espressione dell'attività inibente presente nell'urina e non del processo infettivo in atto. Inoltre nei pazienti con carica batterica significativamente elevata ($> 80^4$ UFC/ml) e PAR-test positivo (11.3% nella nostra casistica) il PAR test può essere utile nel valutare l'efficacia della terapia antibiotica. La ricerca delle sostanze antibatteriche nell'urina rappresenta quindi un doveroso completamento dell'esame colturale, affinché questo risulti attendibile e con un fondato riscontro clinico.

Tabella 1

	Urinocolture	PAR test	PAR test +	PAR test + Urinocolture -	PAR test + Urinocolture + (50^4 - 80^4 UFC/ml)	PAR test + Urinocolture + ($> 80^4$ UFC/ml)
Branche mediche	5711	4452	1550 34,8%	1291 83,3%	76 4,9%	183 11,8%
Branche chir.	5513	4459	1701 38,1%	1604 94,3%	21 1,2%	76 4,5%
Intensivi	721	527	339 64,3%	279 82,3 %	7 2,1%	53 15,6%
Esterni	19223	16394	1715 10,5%	1319 76,9%	111 6,5%	285 16,6%
TOT.	31168	25832	5305 20,5	4493 84,7	215 4,1	597 11,3

P097

ISOLAMENTO E ANTIBIOTICO-RESISTENZA DEI MICRORGANISMI RILEVATI PRESSO IL P.O. "S. MASSIMO" PENNE (PE) NEL PERIODO 2000/2002.

Della Pelle C.; Ridolfi D.; Savini F.; Tresca E.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia P.O. "S. Massimo" Penne (PE).

La comparsa e lo sviluppo nei batteri del fenomeno dell'antibiotico resistenza è di certo una conseguenza inevitabile che deriva dall'impiego dei farmaci ad attività antibatterica. Di particolare ausilio sono soprattutto gli studi tendenti a monitorare il fenomeno sia a livello nazionale sia loco-regionale, i cui risultati devono rappresentare una delle colonne portanti per il razionale impiego dell'antibiotico su base empirica. Scopo della nostra indagine è: valutare la frequenza delle varie specie nel complesso dei pazienti ricoverati e ambulatoriali; verificare la resistenza ai principali antibiotici dagli isolati clinici; conoscere la situazione epidemiologica nel nostro territorio per dare indicazioni utili alla scelta del farmaco di primo impiego nell'attesa dei risultati dell'antibiogramma.

Materiali e metodi: Si sono considerati i germi più frequentemente isolati da materiali biologici (urine, espettorati e materiale respiratorio in genere, punte di catetere, sangue, ferita chirurgica, tamponi, pus). Le tecniche impiegate per la semina dei campioni clinici e l'isolamento sono state quelle convenzionali. Tutti gli stipti batterici sono stati identificati in base alle proprietà biochimiche utilizzando il sistema automatico ViteK (Bio Merieux), gli antibiogrammi sono stati eseguiti anch'essi utilizzando lo stesso sistema automatico.

Risultati: Nel periodo gennaio 2000 - dicembre 2002 i microrganismi di più frequente riscontro sono stati:

Microrganismi	ricoverati	ambulatoriali
<i>E.Coli</i>	39.4 %	48.7 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.9 %	7.3 %
<i>Proteus spp.</i>	8.2 %	13.7 %
<i>Klebsiella spp.</i>	6.2 %	7.3 %
<i>Enterobacter spp.</i>	4.2 %	2.9 %
<i>Enterococcus</i>	10.8 %	9.5 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.7 %	5 %
<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	3.7 %	0.5 %

Analizzando i dati in rapporto alle varie sedi di prelievo le *Enterobacteriaceae* sono la causa più frequente di infezione delle vie urinarie (77%) e delle basse vie respiratorie (63%). Mentre i germi Gram positivi sono i maggiori responsabili di infezioni sistemiche (60%), infezioni di ferite (67%) e cateteri venosi (82%). L'antibioticoresistenza, per la maggior parte degli antibiotici saggiati, è rimasta sostanzialmente invariata nei tre anni considerati.

Conclusioni: Monitorare la flora batterica residente e la frequenza di ceppi resistenti in un dato territorio è molto utile al clinico per un razionale utilizzo degli antibiotici su base empirica. Auspicabile è monitorare in modo costante le resistenze batteriche considerato l'uso mutevole e scarsamente coordinato degli antibiotici anche in ambito loco-regionale.

P098

INFEZIONI VAGINALI IN GRAVIDANZA: UN ANNO DI OSSERVAZIONE.

Ridolfi D., Della Pelle C., Giovanetti C., Tresca E.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia P.O. "S. Massimo" Penne (PE),

L'infezione vaginale batterica può essere responsabile di aborto spontaneo durante il secondo trimestre di gravidanza (13^a-15^a settimana). Lo screening di infezioni genitali, utilizzando tamponi vaginali, è possibile nelle donne in gravidanza, anche non ospedalizzate e potrebbe essere efficace nella prevenzione di esiti avversi che possono avvenire nel corso della gestazione e che sono correlati all'infezione batterica. Studi epidemiologici hanno dimostrato che il 5-40% delle donne gravide è colonizzato da Streptococco gruppo B (SGB) a livello rettale e/o vaginale. La colonizzazione materna in genere è definita mediante ricerca colturale effettuata attorno alla 34^a-36^a settimana di gestazione. Gli SGB possono essere responsabili di rottura prematura delle membrane, parto prematuro o addirittura di grave infezione del neonato contraibile durante il parto.

Obiettivo del nostro lavoro è esaminare la casistica circa le infezioni da SGB ed evidenziare eventuali variazioni del microbiota vaginale in donne gravide rispetto ad una popolazione di riferimento (donne in età fertile, non gravide).

Materiali e metodi: Sono stati esaminati n° 570 tamponi vaginali di cui n° 80 di donne gravide. I prelievi sono stati effettuati mediante tamponi previa introduzione di uno speculum bivalve sterile. È stato valutato il pH vaginale, utilizzando cartine indicatrici, ed eseguito fishy odor test utilizzando una soluzione di KOH al 10%. L'essudato vaginale veniva osservato direttamente a fresco e dopo colorazione di Gram. L'esame colturale è stato eseguito stemperando il tampone in 1 ml di soluzione fisiologica sterile, 100⁷ della quale sono stati seminati per spatolamento su tutta la superficie dei seguenti terreni: Columbia CNA agar, McConkey agar, Chapman agar, Sabouraud con gentamicina e cloramfenicolo agar, Rogosa agar, Gardnerella agar, Modified Tayer Martin agar.

Risultati: Nel 43.8% (35/80) dei tamponi vaginali di donne gravide abbiamo isolato (SGB 34.3%; *Miceti* 31.4%;

Enterobacteriaceae 48,5%; *Enterococcus* spp 14,2%; *Staphylococcus* spp 17,1%; *Mycoplasma* 8,6%). Nell'85% (415/490) dei tamponi vaginali di donne non gravide abbiamo isolato (*SGB* 10,4%; *Miceti* 22,2%; *Enterobacteriaceae* 35,1%; *Enterococcus* spp 8,9%; *Staphylococcus* spp 10,8%; *Mycoplasma* 4,7%; *Trichomonas* 2,2%).

Conclusioni: L'alta frequenza di germi patogeni isolati in donne di età fertile conferma che le infezioni vaginali sono una patologia di frequente riscontro. L'isolamento e l'eradicazione dei germi patogeni, in particolare lo *Streptococcus agalactiae* (Strep.gruppo B) nelle gravide, può evitare le gravi complicanze neonatali conseguenti a infezioni acquisite durante il parto.

P099

INFEZIONI DELLE VIE AEREE IN PAZIENTI ARTIFICIALMENTE VENTILATI RICOVERATI IN TERAPIA INTENSIVA.

*Minniti R.R., *Mariani B., *Angelini M.T., *Pallonari G., *Lavorino C., *Di Clemente S., *Tronci M.

*Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini Roma
U.O.C. Microbiologia e Virologia- S.S. San Camillo.

Obiettivo.

È stato condotto uno studio epidemiologico teso ad individuare le specie batteriche maggiormente coinvolte in colonizzazioni/infezioni delle vie aeree inferiori in pazienti artificialmente ventilati (VAP) ricoverati in 4 unità di terapie intensive dell'A.O. S. Camillo-Forlanini di Roma. La mortalità per polmoniti ospedaliere nei pazienti con VAP in Italia è del 20%.

Materiali e metodi.

Nel periodo Giugno-Dicembre 2003 sono state esaminati 667 campioni di broncoaspirato prelevati da pazienti VAP provenienti da: Terapia Intensiva Cardio Chirurgica (TICCH), 189 campioni; Terapia Intensiva Neuro Chirurgica (TINCH), 57 campioni; Terapia Intensiva Lunga Degenza (TILD), 104 campioni; Terapia Intensiva Centro Rianimazione (TICRN), 317 campioni. Fra tutti i campioni, 333 sono risultati positivi all'esame microscopico con sviluppo colturale = o > a 100.000 UFC/ml. Sui ceppi isolati sono stati eseguiti identificazione biochimica e antibiogramma con il sistema automatico Phoenix (BD).

Risultati.

La positività dei campioni biologici, suddivisi per reparto di provenienza, è risultata così ripartita:

TICCH: 55.0 %; TINCH: 78.9 %; TIRLD: 78.8 %; TICRN: 32.2 %.

Gli isolati, identificati a livello di specie, sono stati poi raggruppati in: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e *Serratia* (Gram -), *Staphylococcus aureus*, e "altri".

La colonizzazione/infezione da Gram negativi, in % per reparto è risultata: TICCH: 68.5 %; TINCH: 50.8 %; TIRLD: 65.5 %; TICRN: 73.6 %.

La colonizzazione/infezione da *Staphylococcus aureus*, in % per reparto, è risultata: TICCH: 21.3 %; TINCH: 33.3 %; TIRLD: 28.6 %; TICRN: 7.3 %.

Considerazioni e Conclusioni.

Dall'analisi dei dati si osserva che il riscontro di Gram negativi è sostanzialmente simile nelle quattro terapie intensive considerate. L'isolamento di *Staphylococcus aureus*, è risultato nettamente minore nella TICNR.

La TICNR ha messo a punto un protocollo che prevede la somministrazione, nelle narici dei pazienti ricoverati VAP, di un antibiotico topico da utilizzare per l'eradicazione di *Staphylococcus aureus* in portatori sani. I dati microbiologici

ci consentono di porre le basi per ipotizzare di sperimentare - dopo aver messo in essere una sorveglianza condotta sulla base degli stessi protocolli già utilizzati - un intervento di profilassi in tal senso, indirizzato a tutti i pazienti VAP ricoverati nelle altre terapie intensive dell'Azienda.

P100

BATTERIEMIE SOSTENUTE DA ENTEROBATTERI PRODUTTORI DI ESBL

*Parisi G., *Minniti R.R., *Mariani B., *Pinzi M.
*Angelosanto P., *Tronci M.

*Azienda Ospedaliera S. camillo-Forlanini Roma
U.O.C. Microbiologia Virologia S.S. S. Camillo.

Scopo del Lavoro

Valutare la prevalenza e la distribuzione di enterobatteri produttori di ESBL, causa di batteriemie in alcuni reparti dell'Azienda Ospedaliera San Camillo - Forlanini di Roma nel periodo Gennaio- Dicembre 2003.

Materiali e Metodi

Nel periodo Gennaio- Dicembre 2003 nel Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale San Camillo sono risultati positivi per Enterobatteri n° 151 campioni di emocolture corrispondenti a 151 pazienti (sono stati esclusi isolamenti ripetuti dello stesso germe nello stesso paziente). I reparti di provenienza erano: Terapia intensiva, Rianimazione, Cardiocirurgia e Medicina. I campioni sono stati processati con il sistema Bactec 9240 (BD), utilizzando flaconi per germi aerobi e anaerobi. Per la tipizzazione biochimica e l'Abg è stato utilizzato il sistema Phoenix (BD): tale sistema permette la rilevazione delle ESBL, rilevazione che tuttavia nei casi in cui venivano rilevati ceppi produttori, si è voluto confermare con E-test.

Risultati

Le 151 batteriemie sostenute da enterobatteri erano così distribuite: 71 da E. Coli (47%); 26 da *Enterobacter cloacae* (17.2%); 20 da *Klebsiella pneumoniae* (13.2%); 4 da *Providencia stuartii* (2.6%); 6 da *Proteus mirabilis* (3.9%); 6 da *Citrobacter freundii* (3.9%); 16 da *Serratia* spp (10.5%); 2 da *Salmonella* spp (1.3%).

Fra questi, sono risultati ceppi produttori di ESBL 25 ceppi (16.5%) così ripartiti: 14 E. coli (56%); 3 *Enterobacter cloacae* (12%); 3 *Klebsiella pneumoniae* (12%); 1 *Providencia stuartii* (4%); 4 *Proteus mirabilis* (16%).

Conclusioni

L'analisi condotta sui dati raccolti ci ha permesso di rilevare che nel nostro Ospedale: 1) secondo quanto previsto dal protocollo la richiesta di emocolture non è mai unica; 2) il prelievo per le emocolture viene effettuato prima dell'inizio della terapia antibiotica, tranne che per le Terapie intensive; 3) le batteriemie sostenute da ceppi produttori di ESBL sono presenti soprattutto da reparti di Medicina e Terapia Intensiva; 4) nei casi di batteriemie sostenute da Gram negativi produttori di ESBL sono quasi sempre presenti fattori di rischio quali ospedalizzazione di durata > di 10 giorni, uso prolungato di cefalosporine di 3^a generazione e ricovero in reparti di Terapia Intensiva.

P101**INFEZIONI RESPIRATORIE E SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI IN DUE UNITÀ OPERATIVE: BRONCOPNEUMOLOGIA E PEDIATRIA**

Venditti W., Bonifati A., Rizzuto A., Tocci M.

Struttura Semplice di Microbiologia P.O. Castrovillari A. S. 2 Castrovillari (CS)

La resistenza batterica agli antibiotici costituisce una minaccia per la salute pubblica contribuendo all'aumento della morbilità, della mortalità e della spesa sanitaria.

Numerose le iniziative intraprese per tenere sotto controllo il problema che vede dopo sessanta anni un gruppo di farmaci salva-vita a rischio.

La resistenza batterica cos'è? la capacità dei batteri, attraverso vari meccanismi, di sopravvivere nonostante l'uso di antibiotici.

I batteri sono organismi a veloce moltiplicazione con grande abilità di adattamento a cambiamenti ambientali e sono anche in grado di scambiarsi informazioni genetiche e diffonderle.

Nello studio portato avanti in un anno di lavoro Maggio 2002 Aprile 2003, abbiamo voluto valutare la suscettibilità agli antibiotici di due tipi di batteri gram positivi responsabili di infezioni delle vie aeree superiori ed inferiori. Streptococco pneumoniae e Stafilococco aureo.

Materiali e metodi

Per lo studio sono stati presi in considerazione 400 escreti di pazienti afferenti la U.O. di Broncopneumologia in regime di ricovero, Day-Hospital od ambulatoriali, 570 tamponi faringei di pazienti afferenti la U.O. di Pediatria anch'essi in regime di ricovero, day-hospital od ambulatoriali. I batteri isolati sono stati rispettivamente 214 per la U.O. di B-P di cui 87 gram positivi, 463 per la U.O. di Pediatria di cui 329 gram positivi.

Dallo studio è stato escluso lo Streptococco piogene. Gli 87 batteri gram positivi della B-P erano così suddivisi: 49 pneumococchi e 38 stafilococchi, i 329 pediatrici erano così divisi: 293 stafilococchi e 36 pneumococchi. Tutti gli isolati sono stati sottoposti ad antibiogramma con i seguenti risultati.

Risultati**STAFILOCOCCO AUREO PERCENTUALI DI SENSIBILITÀ RIGUARDANTI I DUE REPARTI**

	U.O. PEDIATRIA	U.O. BRONCO
CEFTRIAXONE	97%	76.4%
OXACILLINA	89.8%	71.6%
TEICOPLANINA	100%	92.2%
PENICILLINA	2%	7.8%
NETILMICINA	100%	92.2%
TRIM/SULFA	96%	92.2%
AMOC/CLAV	100%	71.6%
RIFAMPICINA	100%	92.2%
VANCOMICINA	100%	92.2%
CLINDAMICINA	94%	86.9%
CEFALOTINA	97%	89.5%
CLARITROMICINA	79%	79%
OFLOXACINA	99%	86.9%
GENTAMICINA	98%	86.9%

SENSIBILITÀ RIGUARDANTI LO PNEUMOCOCCO

	U.O. PEDIATRIA	U.O. BRONCO
VANCOMICINA	100%	89.8%
PENICILLINA	94.9%	85.8%
ERITROCINA	80.8%	55.2%
TETRACICLINA	92.3%	61.3%
AMOX/CLAV	88.5%	79.2%
CAF	98.2%	79.6%
CEFTRIAXONE	91%	71.5%
AMPICILLINA	94.9%	73.6%
CLINDAMICINA	88.5%	71.5%
TRIM/SULFA	89.8%	75.6%

Conclusioni

Pur considerando la minore esposizione dei pazienti pediatrici all'uso od all'abuso degli antibiotici, è evidente la maggiore sensibilità ad essi da parte di questo gruppo.

Per quanto attiene allo Stafilococco l'unica concordanza, si ha per la Claritromicina mentre è ulteriormente diminuita la sensibilità verso la Penicillina 2% nei pediatrici.

Per quanto riguarda lo pneumococco si costata una sensibilità alla Vancomicina in età pediatrica del 100% rispetto all'89.8% della bronco, legata anche alla incidenza più alta di stafilococchi produttori di B-L 26.3% rispetto al 10.2% dei pediatrici.

P102**URINOCOLTURE: FREQUENZA DI ISOLAMENTO DEI GERMI E ATTIVITÀ ANTIMICROBICA. ESPERIENZA DI UN LABORATORIO PRIVATO.**

Vincenti A., Greco F.

*Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia "Data Medica", Via Enrico Toti 5, 51016 Montecatini terme (PT)***Scopo**

Nel nostro laboratorio di Microbiologia le infezioni delle vie urinarie (I.V.U.) sono quelle di più frequente osservazione. Abbiamo perciò svolto un'indagine per valutare l'incidenza nel periodo dal 1998 al 2003 di urinocolture positive, la prevalenza dei microrganismi responsabili delle I.V.U. e evidenziare eventuali trend di resistenza utili ad impostare la terapia di tali infezioni.

Materiali e Metodi

Le urine sono state seminate con ansa calibrata da 10 µl su terreno CPS ID 2 (Bio-Merieux) e sono state considerate positive se presentavano una carica batterica maggiore o uguale a 100.000 UFC/ml.

Le identificazioni delle diverse specie batteriche e i relativi test di sensibilità *in vitro* sono stati eseguiti mediante sistema automatico (VITEK, Bio-Merieux).

Risultati

Nel periodo di studio sono stati analizzati 7070 campioni di urine provenienti da pazienti sia adulti che pediatrici. 1662 ceppi hanno soddisfatto i criteri di positività stabiliti (23,5%).

Tra gli isolati *E. coli* incide per il 52% del totale, *E. faecalis* per l'11% e *P. mirabilis* per l'8%.

Di seguito sono riportate le medie delle percentuali di sensibilità per i tre ceppi batterici.

Antibiotici	E.coli	P.mirabilis	E.faecalis
Acido nalidixico	86	82	
Amikacina	99	100	
Amoxicill./Ac.Clavul.	85	75	
Ampicillina	54	70	93
Aztreonam	98	100	
Cefalotina	66	73	2
Cefotaxime	99	97	
Ceftazidime	99	100	
Ciprofloxacina	92	95	77
Clindamicina			2
Eritromicina			22
Fosfomicina	96	72	14
Gentamicina	97	87	
Gentamicina	500		76
Imipenem	100	99	96
Nitrofurantoina	97	6	98
Norfloxacina	92	96	79
Penicillina G			90
Piperacillina	68	76	96
Streptomina	2000		70
Teicoplanina			98
Tetraciclina			25
Ticarcill./Ac.Clavul.	91	98	
Tobramicina	98	92	
Trimet./Sulfametoss.	81	74	
Vancomicina			98

Conclusioni Per *E. coli* e *P. mirabilis* gli antibiotici più efficaci sono stati: i penemi (imipenem e aztreonam), gli aminoglicosidi (gentamicina, tobramicina e amikacina), le cefalosporine di II (cefotaxime) e di III (ceftazidime) generazione e la ticarcillina+ac.clavulanico; per il cotrimossazolo abbiamo assistito ad una lieve diminuzione di sensibilità negli anni. Per *S. faecalis* le sensibilità maggiori sono state nei confronti delle penicilline (ampicillina, piperacillina e penicillina G) e i glicopeptidi (teicoplanina e vancomicina). Da sottolineare il fatto che anche nella nostra realtà ambulatoriale sono emersi ceppi di *E. faecalis* resistenti alla vancomicina in accordo con l'ormai crescente diffusione di tale resistenza (5 casi negli ultimi tre anni).

P103

INCIDENZA DI CEPPI DI *S. AUREUS* ENTEROTOSSINO-PRODUTTORI ISOLATI DA T. FARINGEO DI PORTATORI ASINTOMATICI.

Muolo V., Andriulo B., Vinci E., *Mosca A., *Miragliotta G.

U.O. Patologia Clinica Ostuni-Fasano, AUSL BR/I,
*Sezione di Microbiologia, Dipartimento MIDIM,
Università di Bari.

Obiettivo. Abbiamo valutato l'incidenza di ceppi di *S. aureus* enterotossinoproduttori, isolati da tampone faringeo di soggetti addetti alle cucine e alla ristorazione in genere, nonché nel personale medico e paramedico, come prescritto dalla Legge 626 in materia di sicurezza degli operatori e di vigilanza sugli alimenti.

Materiali e metodi. I ceppi di *S. aureus* sono stati isolati, nel corso dell'anno 2003, da tampone faringeo di soggetti asintomatici, sottoposti a tale indagine. In particolare sono stati

presi in considerazione 192 soggetti, di cui 121 operatori sanitari e 71 addetti alla ristorazione.

L'isolamento è stato effettuato su terreno MSA. Dopo aver verificato la positività per i test della catalasi e coagulasi, si è proceduto all'identificazione definitiva delle colonie con il sistema semiautomatico Sceptor (Becton Dickinson). I ceppi sono stati incubati per 24 ore in Tryptone Soya Broth (OXOID), raffreddati a 4°C per 30 minuti, quindi centrifugati a 1000 rpm per 20 minuti. Il sovrantante recuperato e filtrato è stato caratterizzato fenotipicamente mediante test RPLA (Oxoid, TD 900, England) che utilizza una reazione di agglutinazione passiva inversa al lattice per la ricerca delle enterotossine di tipo A, B, C e D.

Risultati. Su 192 tamponi faringei esaminati, 50 sono risultati positivi per *S. aureus*. Da quest'ultimi sono stati isolati 22 ceppi di *S. aureus* produttori di enterotossina (44%). In particolare state identificate 23 enterotossine, di cui 8 di tipo A, 8 di tipo B, 2 di tipo C e 4 di tipo D. In un caso vi era la contemporanea presenza dei tipi A e B.

Conclusioni.

A. La percentuale di ceppi enterotossinoproduttori riscontrata nella popolazione da noi indagata evidenzia la problematica esistente sul territorio e la reale necessità che le indagini richieste dalla Legge 626 vengano svolte con accuratezza.

B. La frequenza dei diversi tipi di enterotossina prodotti dai ceppi di *S. aureus* da noi isolati è significativamente elevata per i tipi A e B.

P104

CARATTERIZZAZIONE DELL'ENTEROTOSSINO-GENICITÀ DI CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* MEDIANTE MULTIPLEX PCR

Zerbini L., Larini S., Rossi S., Bertoncini L., Somenzi P., Menozzi M.G., Chezzi C. e Dettori G.

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

Obiettivo della ricerca è stato quello di mettere a punto un metodo di multiplex PCR in grado di rivelare sequenze geniche codificanti per enterotossine in ceppi di *Staphylococcus aureus* di origine umana e/o alimentare.

La multiplex PCR è stata allestita utilizzando cinque coppie di primers, già descritte in precedenti studi, che consentono di ottenere 5 prodotti di amplificazione di diverso peso molecolare. Tali primers sono specifici per i geni delle principali enterotossine stafilococciche (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) che, come è noto, sono una delle cause più frequenti di tossinfezione alimentare.

L'efficacia del metodo nel caratterizzare l'enterotossinogenicità di ceppi di *S. aureus* è stata valutata applicando la multiplex PCR su 129 ceppi isolati da campioni fecali in un periodo di circa 9 mesi.

Quarantadue (32,6%) dei 129 ceppi analizzati sono risultati positivi per uno o più geni *se*. In particolare, 23 ceppi (54,8%) possedevano il gene *sea*, 3 ceppi (7,1%) il gene *seb*, 10 ceppi (23,8%) il gene *sec*, 4 ceppi (9,5%) il gene *sed* e, infine, 2 ceppi (4,8%) contemporaneamente i geni *sea* e *sed*. Tutti i 42 ceppi *se*-positivi sono stati sottoposti a saggio di agglutinazione al lattice passiva inversa ("SET-RPLA Staphylococcal Enterotoxin test kit", Oxoid), per verificare la loro capacità a produrre *in vitro* la/e tossina/e corrispondente/i. Quarantuno ceppi (97,6%) sono risultati produttori *in vitro* della/e relativa/e enterotossina/e. Un ceppo *sea*-posi-

tivo ha dato invece un risultato non interpretabile.

La multiplex PCR, messa a punto, si è dimostrata un metodo rapido ed utile per caratterizzare l'enterotossinogenicità di ceppi isolati di *S. aureus*. Il metodo dovrebbe, comunque, essere associato alla rilevazione con RPLA delle tossine stesse, che riscontrate direttamente nel campione consentono di stabilire un nesso eziologico con lo stato di malattia. Il ritrovamento delle tossine è, tuttavia, in questo caso fortemente condizionato dalla qualità del campione.

P105

SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA DELLA TUBERCOLOSI: DIECI ANNI DI OSSERVAZIONE NELL'AREA MARSICANA DELLA REGIONE ABRUZZO

Nardone G. °, Calella G. *, Paoloni M. *, Occhiuzzi U. °, Mariani R. *, Ranelli A. *

°: Servizio di Patologia Clinica, P.O. Avezzano, ASL Avezzano-Sulmona

*: U.O. Malattie Infettive, P.O. Avezzano, ASL Avezzano-Sulmona

Introduzione

La tubercolosi, negli ultimi dieci anni, ha rappresentato per l'Europa e per l'Italia un rilevante problema di sanità pubblica. In Italia la riforma del SSN nel 1978 aveva di fatto eliminato la possibilità di un monitoraggio epidemiologico nazionale, creando così una pericolosa indifferenza nei confronti della malattia tubercolare. Le statistiche dell'OMS e le segnalazioni di singole regioni hanno documentato per l'Italia un costante aumento dei casi notificati negli anni '90, determinando una rinnovata attenzione verso tale problema. Abbiamo quindi deciso di effettuare una valutazione retrospettiva dei casi diagnosticati negli anni 1993-2003 presso il nostro presidio ospedaliero.

Materiali e metodi

Nell'ambito dei programmi di sorveglianza delle infezioni ospedaliere, sono stati valutati retrospettivamente tutti i campioni biologici processati dal Laboratorio Analisi per la ricerca di *Mycobacterium* spp. negli anni 1993-98 e 1998-2003. I campioni sono stati regolarmente sottoposti a procedura di decontaminazione con NALC-NaOH al 2%, ad esame batterioscopico previa colorazione con metodica Ziehl-Neelsen e quindi ad esame colturale su terreno Loewestein-Jensen.

Risultati e discussione

Nel primo quinquennio sono stati analizzati complessivamente 1120 campioni (700 espettorati, 250 urine, 170 vari) con il riscontro di 57 esami colturali positivi (5%). Nel quinquennio 1998-2003 sono stati invece analizzati 1550 campioni (900 espettorati, 300 urine, 350 vari) con la registrazione 127 esami colturali positivi (8,1%). I ceppi micobatterici isolati in coltura sono stati quindi inviati all'Istituto Zooprofilattico "G. Caporale" di Teramo per la successiva identificazione con tecniche di biologia molecolare. Tutti ceppi sono risultati essere appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex. Il notevole aumento dei campioni inviati al Laboratorio Analisi e l'incremento significativo delle positività, circa il 3% in cinque anni, confermano anche nella nostra area geografica la riemergenza della patologia tubercolare.

P106

ISOLAMENTO DI MICOBATTERI PRESSO L'OSPEDALE MAGGIORE DI NOVARA NEGLI ANNI 1994-2003

Camaggi A., Andreoni S., Molinari G.L., Crespi I., Fortina G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Maggiore Novara

Negli anni 1994-2003, la ricerca di micobatteri praticata presso l'Ospedale Maggiore di Novara in 9.510 campioni di provenienza umana (escreti, broncolavaggi, urine, aspirati sinoviali, pleurici, pericardici, gastrici, ecc.), ha portato all'isolamento di 395 ceppi di micobatteri, dei quali 235 (59,4%) appartenenti al gruppo *Myc. tuberculosis* complex e 160 (40,6%) classificati come MOTT e suddivisi, in base ad identificazione ottenuta con sonde genetiche in *Myc. avium* complex, *Myc. avium*, *Myc. intracellulare*, *Myc. gordonae*, *Myc. kansasii*. I micobatteri non identificati mediante sonde genetiche sono stati classificati come "Micobatteri non identificati" fino alla fine del 2002. Dal 2003 i micobatteri di quest'ultimo gruppo sono stati invece identificati a livello di specie, mediante l'utilizzazione di un test di ibridazione inversa. Dall'analisi di questi ultimi dati, è stato possibile rilevare come, nell'ambito dei MOTT non identificabili mediante sonde genetiche, i micobatteri più diffusi nelle nostre zone siano risultati essere il *Myc. marinum* seguito da *Myc. chelonae* e *Myc. xenopi*.

Confrontando in successione i risultati della frequenza di isolamento di micobatteri ottenuti negli ultimi 10 anni presso l'Ospedale Maggiore di Novara, è stato possibile registrare un lieve calo di positività nell'anno 1995 cui ha fatto seguito un rialzo costante fino al 1999. Tale aumento è risultato particolarmente evidente a livello di micobatteri non tubercolari che, isolati in quantitativi non significativi fino al 1997, hanno invece in seguito toccato notevoli frequenze di isolamento, probabilmente per l'introduzione, presso la micobatterologia del nostro Ospedale, dei terreni colturali liquidi.

Interessante rilevare come nel 2000 si sia invece assistito ad un brusco calo nella frequenza di isolamento tanto di micobatteri tubercolari quanto non tubercolari che ha portato ad un quasi dimezzamento delle loro rilevazioni.

Invertendo la tendenza, dal 2001 al 2003, le frequenze di isolamento dei due gruppi di micobatteri sono invece tornate a salire e, nell'ultima annata, si è tornati vicini al picco di isolamento verificatosi nel 1999.

P107

PRESENTAZIONE DA UN AVIUM COMPLEX: PRESENTAZIONE DI UN CASO CLINICO

Caola I., Sella D. *, Dalpiaz A. *, Guerzoni M.L. *, Sartori R., Caciagli P.

Lab. Microbiologia e Virologia, Osp. S. Chiara, Trento

* U.O. Pneumologia, Ospedale S. Chiara, Trento

Introduzione. Nelle persone immunocompetenti la pneumopatia da micobatteri non tubercolari è rara, di difficile definizione diagnostica e comporta una gestione terapeutica complessa, prolungata, dall'esito talora incerto. I micobatteri appartenenti al complesso MAC (*Mycobacterium avium* complex) sono i patogeni più frequentemente responsabili. Per la diagnosi, i dati microbiologici indispensabili sono la

positività di almeno due esami colturali dell'espettorato oppure di almeno un broncoaspirato, in contesto clinico-radiologico compatibile. La sintomatologia, aspecifica, può richiamare tutte le broncopneumopatie croniche infettive. Gli aspetti radiologici possono essere indistinguibili da quelli della tubercolosi polmonare oppure caratterizzati da bronchiectasie, in frequente associazione con opacità focali, noduli o micronoduli.

Caso clinico. Pneumopatia da MAC in uomo di 64 anni, immunocompetente, non fumatore, con storia clinica di riacutizzazione bronchitiche recidivanti, spesso accompagnate da emoftoe, esordita circa 7 anni prima. Nel corso dei vari ricoveri ospedalieri, il paziente è stato riconosciuto portatore di bronchiectasie medio polmonari bilaterali accompagnate da piccole aree di consolidamento parenchimale. Dai numerosi esami colturali dell'espettorato e dal broncoaspirato sono isolati ripetutamente *S. aureus* e *H. influenzae* spesso in associazione; la coltura per micobatteri è risultata sempre negativa. In corso di ennesima riacutizzazione bronchitica l'esame colturale del lavaggio bronchiolo-alveolare (BAL) ha rivelato la presenza di MAC. Poiché l'antibiotico-terapia aspecifica, già adottata nel contempo, aveva determinato un netto miglioramento, si ritenne clinicamente non conclusivo l'isolamento ottenuto. Nel BAL prelevato ad un controllo broncoscopico successivo si è confermata la presenza di MAC, avvalorando la diagnosi di micobatteriosi polmonare non tubercolare. I MAC sono stati isolati poi anche da diversi campioni di espettorato. Il paziente è in tgrattamaneto, previsto della durata complessiva di almeno 18 mesi, con claritromicina, etambutolo e rifabutina. Non è dato sapere con certezza se la pneumopatia da MAC sia insorta su bronchiectasie preesistenti e misconosciute, oppure se queste si siano formate in conseguenza della infezione da micobatteri.

Conclusioni. Il caso osservato pone in risalto la necessità di ricercare con accuratezza i MOTT, soprattutto su prelievi broncoscopici, nei pazienti immunocompetenti affetti da bronchiectasie che presentino riacutizzazioni bronchitiche frequenti. Il contributo del microbiologo risulta fondamentale nel supportare il clinico nella definizione di diagnosi difficili e complesse.

BIBLIOGRAFIA

1. Catanzaro A., Daley C.L., Guets eds. Lung disease due to Nontuberculous Mycobacterial Infections. Clin Chest Med 2002;23:529-686

P108

PREVALENZA DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX (MTC) E DI MICOBATTERI NON TUBERCOLARI (MOTT) IN UNA POPOLAZIONE ETEROGENEA DI PAZIENTI

Cava M.C.¹, Longo R.¹, Cappiello G.¹, De Sandro M.V.¹, Tuccinardi C.¹, Spanò A.¹

¹Ospedale "S.Pertini", Roma

M.tuberculosis è responsabile del 80-90% della patologia tubercolare nel suo insieme, ma sono altresì in aumento patologie da specie non tubercolari (MOTT) di origine ambientale, quali ad esempio quelle legate al *M.avium*-intracellulare a diffusione ubiquitaria. Si rende pertanto necessario identificare i MOTT e discriminare correttamente le specie potenzialmente patogeniche.

Il nostro laboratorio, dal 1/6/2002 al 31/12/2003, ha arruolato per la ricerca dei micobatteri 588 pazienti così distribuiti: 309 ospedalizzati (52%), 109 ambulatoriali (19%), e 170

relativi ad una comunità penale (29%).

I materiali (prevalentemente escreti) sono stati inoculati, dopo opportuno procedimento di decontaminazione, in terreno solido di LJ (Löwenstein-Jensen) e in terreno liquido fluorimetrico MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) e processati dal sistema automatico BACTEC MGIT 960.

Le colture positive sono state amplificate e ibridate per la regione codificante l'rRNA 16S.

54/588 (9.2%) pazienti risultavano positivi per micobatteri (età mediana 54.5, range 24-87); di questi il 44% erano tipizzati come MTC, il 54% come MOTT; il 2% non era tipizzabile. I batteri del MTC erano riscontrati per il 58% in pazienti ospedalizzati; non si evidenziavano differenze significative di frequenza tra pazienti ambulatoriali e quelli della comunità penale (17% vs 25%, p=0.630). Tra i MOTT le specie più frequenti erano rappresentate da *M.xenopi*, *gordonae* e intracellulare (93%). *M.xenopi* era riscontrato soprattutto tra pazienti ospedalizzati, *M.gordonae* e intracellulare maggiormente tra pazienti ambulatoriali.

Poiché negli ultimi decenni si è registrato un aumento delle patologie da micobatteri, legato sia all'immigrazione sia alla sopravvivenza di pazienti immunocompromessi (per infezione da HIV e/o terapie immunosoppressive), è necessario poter identificare, tra i MOTT, sia le specie riconosciute patogeniche in pazienti immunocompetenti sia le specie opportunistiche. È auspicabile in futuro una rapida diagnosi differenziale anche tra le specie MOTT, con tecniche di biologia molecolare, direttamente su materiali biologici senza pretrattamento.

P109

TUBERCOLOSI COME CAUSA DI FUO

*Cossellu S., Lepori G., Ledda F., Satta A.

^{*}Laboratorio di Analisi, P.O. di Sassari- AUSL n° I
Istituto di Patologia Medica, Università di Sassari

La FUO è una condizione clinica caratterizzata da temperatura di 38,3 °C in diverse determinazioni, indagnosticata dopo una settimana di studio in ospedale. Essa rimane tale nel 10% dei casi, nel 30-40 % è dovuta ad infezioni, nel 20-30% a malattie del collagene, nel 20-30 % a neoplasie, a cause iatrogene nel 15-20 %.

Nel mondo la tubercolosi è una frequente causa di FUO; in Italia è relativamente rara anche se sottodiagnosticata.

Descriviamo un caso di FUO rivelatasi un'infezione da *M. tuberculosis*.

Nell'aprile 2003 venne alla nostra osservazione un uomo di 77 anni per febbre persistente (> 38°C), astenia, calo ponderale (~6 Kg). La sintomatologia, esordita a gennaio, fu attribuita ad influenza, vennero comunque eseguiti ambulatoriamente: Rx torace (negativo), esami ematochimici nella norma eccetto VES (>100), PCR (13.3 mg/dl), fibrinogeno (699 mg/dl), elettroforesi (modesto picco monoclonale). Ricoverato in ematologia, dopo esami di routine e specialistici si escludono patologie ematologiche, ma non fu posta diagnosi.

Al ricovero presso noi: esame clinico negativo; alterazione degli indici di flogosi, emoculture, urinocoltura, escretocoltura: negative; Rx e TC torace: modesto versamento pleurico basale destro; PPD positiva. Ricerca bacilli AA resistente positiva nel liquido gastrico e urine; coltura e PCR confermarono trattarsi di *M. tuberculosis*; le stesse indagini negative su escreato, liquido pleurico, BAL.

Il paziente, posto in terapia con isoniazide, etambutolo, rifampicina, dopo sei mesi presenta remissione dell'iperpiressia, miglioramento dell'astenia, riduzione indici di flogo-

si e del versamento pleurico.

La tubercolosi in Italia ha bassa incidenza, tuttavia è oggi più frequente sia per i flussi migratori che per le immunodeficienze acquisite. Usualmente viene diagnosticata precocemente. Essa deve essere sempre inclusa nelle ipotesi diagnostiche di FUO ricercando il micobatterio anche con metodiche complesse, in tutte le sedi, pur in assenza di cause predisponenti.

Nel nostro caso l'infezione tubercolare diffusa è stata identificata dopo indagini batterioscopiche, colturali e di biologia molecolare eseguite in assenza di chiara localizzazione di malattia.

P110

UNA "STRANA LEBBRA": ULCERA DEL BURULI ISOLAMENTO DI M.ULCERANS DA PRELIEVI BIOPTICI DI PAZIENTI DEL BURKINA FASO.

Costa D., Tortoli E.*, Passidomo D., Gaudiomonte V., Ostuni G.*, Sisto F.*, Navach V.*, Quarto M.

- Laboratorio Micobatteri, U.O. Igiene, Epidemiologia e Sanità
Pubblica A.O. Policlinico Bari

- * U.O. di Chirurgia plastica ricostruttiva osp. A.O. Policlinico Bari

- ** U.O. di Microbiologia e Virologia A.O. Careggi Firenze

Malattia infettiva della pelle, l'Ulcer del Buruli, è la terza infezione micobatterica più comune dopo la tubercolosi e la lebbra, distrugge la pelle, i tessuti sottostanti e causa deformità. L'agente eziologico è il *M. ulcerans*, identificato e classificato nel 1948 da Mac Callum, in Australia dove è conosciuta come l'Ulcer del Bairnsdale, mentre la descrizione dei primi casi risale al 1897 nel Buruli in Uganda, da parte di Sir Robert Cook. A differenza degli altri micobatteri, *M. ulcerans* produce una tossina che distrugge i tessuti e sopprime il sistema immunitario. Le lesioni colpiscono in gran parte gli arti inferiori e superiori interessando una fascia d'età inferiore ai 15 anni (range 2-14). L'unico trattamento possibile è quello chirurgico, la terapia antibiotica con farmaci antitubercolari non mostra benefici.

Nella maggior parte dei 27 paesi colpiti (terre umide dei paesi tropicali e subtropicali), la malattia non viene considerata un problema prioritario di salute pubblica; pertanto non si conosce né il numero di casi né la distribuzione attuale.

Dal 1980, l'Ulcer del Buruli è considerata una malattia emergente in Africa Occidentale; seppur poco conosciuta, altamente invalidante, ma quasi mai mortale, ha un impatto sociale violento nelle popolazioni rurali delle zone colpite. Obiettivo della ricerca è stato quello di isolare in coltura primaria *M. ulcerans*, di non facile isolamento date le sue condizioni di crescita legate alla concentrazione di bacilli presenti nel campione, alla temperatura (30-33°C), alla sensibilità nei confronti dei tradizionali metodi di decontaminazione e alla concentrazione di ossigeno.

Materiali e metodi: Sono state esaminate 14 biopsie prelevate da ulcere localizzate in diverse parti del corpo e degli arti di giovani adolescenti residenti in Burkina Faso sottoposti a trattamento di ricostruzione di chirurgia plastica.

I campioni, conservati sia in terreno di trasporto (7H9+PANTA) sia a secco ad una T° tra i 30 e i 33°C, sono stati esaminati nel laboratorio dell'U.O. di Igiene II del Policlinico di Bari dopo circa 10-15gg dal prelievo eseguito dai chirurghi plastici e sottoposti alle normali procedure per la diagnostica micobatterica: esame microscopico sec. Ziehl-Neelsen, esame colturale in terreni liquidi e solidi. Sulle colonie di *M. ulcerans*, isolate dopo 5-8 settimane dall'inoculo, sono state eseguite prove biochimiche tradizionali,

il test INNO LIPA Mycobacteria V2 e l'identificazione mediante analisi dei lipidi della parete (HPLC).

Risultati e conclusioni:

- Dei 14 campioni esaminati, 8 hanno mostrato coltura positiva con isolamento di *M. ulcerans*
- Dei 6 preparati con microscopia positiva (tutti con presenza di ciuffi di bacilli acido resistenti), soltanto un campione non ha mostrato sviluppo in coltura (probabilmente per l'elevata sensibilità del micobatterio ai tradizionali metodi di decontaminazione)
- L'elevata prevalenza di isolamenti ottenuta (57%), dimostra che i campioni clinici pervenuti alla nostra osservazione erano sicuramente idonei nonostante i tempi di attesa prima dell'inoculo in coltura.

	Micr.(-)	Micr. (+)
Colt. (-)	5	1
Colt. (+)	3	5

Seppure con dati preliminari il nostro studio dimostra come la diagnostica tradizionale, associata alla biologia molecolare e alla cromatografia, sia stata fondamentale per la corretta identificazione di un micobatterio poco conosciuto come *M. ulcerans*.

P111

TUBERCOLOSI FARMACO E MULTIFARMACO - RESISTENTE IN PUGLIA. OSSERVAZIONI SU UNA CASISTICA DI CINQUE ANNI (1998-2003)

Costa D.; Russo L.; Gaudiomonte V.; Passidomo D.; Grimaldi A., Quarto M.

Laboratorio Micobatteri, U.O. Igiene, Epidemiologia e Sanità
Pubblica A.O. Policlinico Bari

Introduzione: Gli attuali regimi chemioterapici possono virtualmente curare il 100% delle tubercolosi causate da *M. tuberculosis* (M.t.) sensibile o resistente alla sola Isoniazide, la TB-MDR (M.t. resistenti almeno alla Isoniazide e alla Rifampicina) viene, invece, associata ad una percentuale bassa di cura e ad un alto tasso di mortalità.

In anni recenti è stato registrato un globale aumento di TB-MDR. Il problema sembra essere più contenuto in Europa; in Italia sono limitati i dati disponibili sulla resistenza di M.t. ai farmaci.

Allo scopo di stimare l'attuale diffusione di Tb causata da M.t. farmaco-resistente, nel presente studio sono stati analizzati i risultati di farmaco-suscettibilità dei ceppi di M.t. isolati in un quinquennio in una precisa area geografica del nostro Paese.

Materiali e metodi: Sono stati valutati i test di sensibilità fenotipici effettuati su 244 ceppi di *M. tuberculosis* (di cui 185 nuovi casi, 59 recidive) isolati da 11.366 campioni e da 244 pazienti diversi.

L'antimicobatterigramma indiretto è stato eseguito in doppio su tutti i ceppi isolati di *M. tuberculosis* impiegando il "Metodo ridotto delle proporzioni" sia in terreno antibiotato solido L-J medium, sia in terreno liquido 7H9 (sistema Bactec MGIT 960). Le farmacosensibilità riscontrate nelle due metodiche sono risultate del tutto sovrapponibili.

Risultati e discussione: Da Gennaio 1998 a Gennaio 2003 sono stati effettuati 244 test di sensibilità su isolati corrispondenti a pazienti affetti da Tbc, cioè 149 uomini (61,1%) e 95 donne (38,9%), 185 prime diagnosi e 59 recidive. Erano inclusi 16 pazienti stranieri (tutti prime diagnosi).

I dati forniti da questo studio (tab.) dimostrano che:

- Il livello di resistenza ad almeno un farmaco era del 22,9% durante il periodo preso in esame.
La resistenza alla Streptomicina era la più rappresentata tra le monoresistenze (sia nei nuovi casi sia nelle recidive).
- Non si è osservata alcuna monoresistenza per l'Etambutolo.
- Casi di resistenza a più farmaci (NO-MDR) varia di poco se si considerano i nuovi casi (3,7%) e le recidive di malattia tubercolare (3,4%).
- La MDR era complessivamente del 4,4% ma limitata nelle prime diagnosi (0,5%) rispetto alle recidive (17%).
- Dei 16 isolati provenienti da pazienti stranieri (tutti prime diagnosi), 14 erano sensibili a tutti i farmaci testati; si è osservata una singola resistenza alla STR (6,2%) e una doppia resistenza NO-MDR (RIF-EMB) (6,2%). Nessuno era MDR.
- Nella popolazione esaminata, quindi, la diffusione di ceppi MDR relativa alle tubercolosi di 1° accertamento sembra essere trascurabile.

Resistenza ai farmaci antitubercolari in 244 ceppi di <i>M. tuberculosis</i> isolati in Puglia				
Farmaci	NUOVI CASI (n=185)		RECIDIVE (n=59)	
resist. ad 1 farmaco	n	%	n	%
INH	9	4,9	4	6,8
RIF	1	0,5	2	3,3
STR	26	14	5	8,5
EMB	0	0	0	0
PIZ	2	1,1	3	5,1
Totale	38	20,5	14	23,7
resist. a più farmaci (no MDR)				
INH+STR	2	1,1	-	-
EMB+STR	3	1,6	-	-
EMB+RIF	1	0,5	-	-
INH+EMB+STR	1	0,5	-	-
INH+STR+PIZ	-	-	1	1,7
STR+RIF	-	-	1	1,7
Totale	7	3,7	2	3,4
resist. a più farmaci (MDR)				
INH+RIF	1	0,5	2	3,4
INH+RIF+STR	-	-	1	1,7
INH+RIF+PIZ	-	-	2	3,4
INH+RIF+STR+EMB	-	-	1	1,7
INH+RIF+EMB+PIZ	-	-	1	1,7
INH+RIF+STR+EMB+PIZ	-	-	3	5,1
Totale	1	0,5	10	17
Stipiti sensibili ai 5 farmaci				
INH+RIF+STR+EMB+PIZ	139/185	75,1	33/59	55,9

P112

MONITORAGGIO DELLA RESISTENZA DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* NELL'AREA DI FOGGIA, PUGLIA.

Di Taranto A, *Mosca A, De Nittis R., Antonetti R., *Miragliotta G..

*Sezione di Microbiologia, Dip. MIDIM, Università di Bari, P.zza G. Cesare, 70124 Bari

Scopo: La tubercolosi rappresenta oggi un problema riemergente di sanità pubblica soprattutto in relazione alla selezione di ceppi multiresistenti (MDR). Il nostro lavoro è stato quello di valutare l'andamento dell'antibiotico resistenza di *M. tuberculosis* prendendo in esame i dati riguardanti gli ultimi 4 anni.

mi 4 anni.

Materiali e metodi: Negli anni 2000-2003 nel laboratorio di Microbiologia degli Ospedali Riuniti di Foggia sono stati valutati per la ricerca di *M. tuberculosis* 2744 (590, 623, 664, 867) campioni respiratori provenienti da pazienti ospedalizzati ed ambulatoriali. Il sistema Bactec 960 TB (Becton&Dickinson) è stato utilizzato per l'isolamento, mentre per la valutazione della sensibilità ai farmaci antitubercolari tradizionali (RIF, SM, EMB, IHN) è stato utilizzato il sistema MGIT.

Risultati: Sono stati isolati 182 (45, 48, 30, 59) ceppi di *M. tuberculosis*. La percentuale annuale di positività ottenuta è stata rispettivamente del 7.6%, 7.7%, 4.5% e 6.8%. I dati di sensibilità sono riportati in tabella

Anno	N° ceppi					
	sensibili			resistenti		
		SM	INH	SM, INH	EMB	MDR
2000	34	7	1	3		
2001	42	5	1			
2002	19	4	4		1	2
2003	43	6	5	2		3

Conclusioni: I risultati mostrano che negli ultimi 4 anni l'incidenza della malattia tubercolare è rimasta pressoché invariata ma il dato degno di attenzione è stato la comparsa nel 2003 dei primi 3 ceppi di *M. tuberculosis* resistenti a RIF e INH da noi isolati.

P113

EPISODIO FAMILIARE DI TUBERCOLOSI POLMONARE DA *MYCOBACTERIUM BOVIS*

* Fabio A., ** Perilli C., ** Greci M., ***Martino A.

*Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

** Igiene Pubblica, Reggio Emilia

***Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche, Biostatistiche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

Viene descritto un episodio di tubercolosi polmonare da *Mycobacterium bovis* che ha coinvolto in sequenza tre componenti della stessa famiglia. Il primo paziente (nato nel 1943, residente a Reggio Emilia, di professione operaio) che presentava dal novembre 1999 tosse produttiva e dispnea da sforzo ed aveva sempre rifiutato accertamenti, veniva ricoverato in ospedale il 6.7.2000. L'esame culturale su broncoaspirato ed espettorato risultò positivo per *Mycobacterium tuberculosis* complex ed all'identificazione risultò trattarsi di *Mycobacterium bovis*. Il paziente era addetto alla manutenzione del depuratore fanghi di una ditta di lavorazione carni. Al controllo effettuato sui 3 conviventi e su una figlia non convivente, il broncoaspirato della figlia convivente, ricoverata 20 giorni dopo il padre, risultò positivo per *Mycobacterium tuberculosis* complex ed identificato come *Mycobacterium bovis*. I due ceppi isolati dal padre e dalla figlia, sottoposti a RFLP DNA fingerprinting e spoligotyping, hanno presentato un identico pattern. Gli altri familiari risultarono negativi alla Mantoux. La figlia non convivente, HIV positiva da circa due anni, nel giugno 2003 tornò a vivere in famiglia. Ricoverata per sospetta tubercolosi polmonare il 31.10.2003, risultò negativa alla Mantoux e positiva all'esame microscopico; gli esami culturali del broncoaspirato e dell'espettorato effettuati con Bactec Migit 960 risultarono entrambi positivi per *Mycobacterium tuberculosis* complex. Alle prime prove biochimiche il ceppo isolato

sembra appartenere alla specie *Mycobacterium bovis*; la tipizzazione è tuttora in corso. Questo episodio di probabile trasmissione interumana, verificatosi in un'area pressoché indenne da tubercolosi bovina, può rappresentare, qualora completamente chiarito, un evento degno di attenzione al fine dell'adozione di adeguate norme di prevenzione. La tipizzazione dei ceppi con metodi molecolari potrà meglio contribuire alla identificazione della catena di trasmissione ed alla conoscenza delle caratteristiche biologiche degli isolati.

P114

PRESENTAZIONE DA UN AVIUM COMPLEX: PRESENTAZIONE DI UN CASO CLINICO

Caola I., Sella D.*, Dalpiaz A.*, Guerzoni M.L.*, Sartori R., Caciagli P.

Lab. Microbiologia e Virologia, Osp. S. Chiara, Trento

* U.O. Pneumologia, Ospedale S. Chiara, Trento

Introduzione. Nelle persone immunocompetenti la pneumopatia da micobatteri non tubercolari è rara, di difficile definizione diagnostica e comporta una gestione terapeutica complessa, prolungata, dall'esito talora incerto. I micobatteri appartenenti al complesso MAC (*Mycobacterium avium* complex) sono i patogeni più frequentemente responsabili. Per la diagnosi, i dati microbiologici indispensabili sono la positività di almeno due esami culturali dell'espettorato oppure di almeno un broncoaspirato, in contesto clinico-radiologico compatibile. La sintomatologia, aspecifica, può richiamare tutte le broncopneumopatie croniche infettive. Gli aspetti radiologici possono essere indistinguibili da quelli della tubercolosi polmonare oppure caratterizzati da broncochiectasie, in frequente associazione con opacità focali, noduli o micronoduli.

Caso clinico. Pneumopatia da MAC in uomo di 64 anni, immunocompetente, non fumatore, con storia clinica di riacutizzazione bronchitiche recidivanti, spesso accompagnate da emoftoe, esordita circa 7 anni prima. Nel corso dei vari ricoveri ospedalieri, il paziente è stato riconosciuto portatore di broncochiectasie medio polmonari bilaterali accompagnate da piccole aree di consolidamento parenchimale. Dai numerosi esami culturali dell'espettorato e dal broncoaspirato sono isolati ripetutamente *S. aureus* e *H. influenzae* spesso in associazione; la coltura per micobatteri è risultata sempre negativa. In corso di ennesima riacutizzazione bronchitica l'esame culturale del lavaggio bronchiolo-alveolare (BAL) ha rivelato la presenza di MAC. Poiché l'antibiotico-terapia aspecifica, già adottata nel contempo, aveva determinato un netto miglioramento, si ritenne clinicamente non conclusivo l'isolamento ottenuto. Nel BAL prelevato ad un controllo broncoscopico successivo si è confermata la presenza di MAC, avvalorando la diagnosi di micobatteriosi polmonare non tubercolare. I MAC sono stati isolati poi anche da diversi campioni di espettorato. Il paziente è in tgrattamaneto, previsto della durata complessiva di almeno 18 mesi, con claritromicina, etambutolo e rifabutina. Non è dato sapere con certezza se la pneumopatia da MAC sia insorta su bronchiectasie preesistenti e misconosciute, oppure se queste si siano formate in conseguenza della infezione da micobatteri.

Conclusioni. Il caso osservato pone in risalto la necessità di ricercare con accuratezza i MOTT, soprattutto su prelievi broncoscopici, nei pazienti immunocompetenti affetti da bronchiectasie che presentino riacutizzazioni bronchitiche frequenti. Il contributo del microbiologo risulta fondamentale

nel supportare il clinico nella definizione di diagnosi difficili e complesse.

BIBLIOGRAFIA

1. Catanzaro A., Daley C.L., Guets eds. Lung disease due to Nontuberculous Mycobacterial Infections. Clin Chest Med 2002;23:529-686

P115

DETECTION OF ETHAMBUTOL-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS BY A PYROSEQUENCING METHOD TARGETING *EMB* CODON 306 VARIATIONS

Isola D.*, Pardini M., Varaine F., Fattorini L., Orefici G., Meacci F., Trappetti C., Oggioni M.R., the LONG-DRUG study group and Orrù G*.

* Università degli Studi di Cagliari -

Dip. Scienze Odontostomatologiche -

O.B.L. Oral Biotechnology Laboratory - Cagliari

Resistance to ethambutol (EMB) in *Mycobacterium tuberculosis* strains has been assigned to an operon, *embCAB* encoding arabinosyl transferases, the putative targets of the drug. Mutations in the *embB* gene lead to resistance to EMB in *M. tuberculosis*. The majority of mutations described so far that lead to EMB resistance mapped to codon 306.

Using the pyrosequencing technology we analysed a 24 bp region of the *embB* gene corresponding to codon 306 to 313 in 29 clinical isolates. A suspension of heat-inactivated bacterial cells was used for PCR amplification of a 344 bp fragment of *embB* using a forward 5' biotinylated primer. The biotinylated PCR product was immobilized to streptavidin-coated beads. The beads were transferred to a filter plate and single stranded DNA was separated by subsequent steps: vacuum filtration and denaturation by a specific denaturation solution, following the standard protocol. The single strand template was annealed at 60°C for 5 minutes with sequencing primer (OG 242). The samples were sequenced on a PSQ 96 System and analysed with SQA software. In 29 *M. tuberculosis* clinical isolates, 9 (31 %) contained mutations in *embB* at the 306 codon with 3 different alleles. In particular the observed mutations were: ATG306ATA (4), ATG306ATC (3) and ATG306GTG (2).

Results demonstrate that this method is able to detect *embB* mutations in very short time (max 5 hours for 96 samples) and represents a valid molecular method to predict resistance to EMB in *M. tuberculosis* clinical isolates.

The LONG-DRUG study group is composed of Marco R. Oggioni, Francesca Meacci, Università di Siena, Francesco Checchi, Epicentre Paris, Graziella Orefici, Manuela Pardini, Lanfranco Fattorini, Istituto Superiore di Sanità Roma, Peter Andrew, Mike Barer, University of Leicester, Heinz Rinder, University of München, Sabine Rüscher-Gerdes, Stefan Niemann, Research Centre Borstel, Germano Orrù, Università di Cagliari, Francis Varaine, Médecins Sans Frontières Paris, and Thierry Jarosz 3Es Paris. The LONG-DRUG study is supported by EC grant QLK-CT-2002-01612.

P116

STUDIO DI UN METODO RAPIDO MEDIANTE RIDUZIONE DI XTT PER LA DETERMINAZIONE DELLA RESISTENZA IN *M. TUBERCULOSIS*

Saddi M.^a, Sanna C.^a, Borgna R.^a, Sanna A.^a, Saddi B.^c, De Logu A.^a

^aSezione di Microbiologia Medica, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Cagliari,
Viale Sant'Ignazio 38, 09123 Cagliari
^cLaboratorio di Analisi Ospedale SS. Trinità, Cagliari

Fino a qualche anno fa la tubercolosi era ormai considerata una malattia a basso rischio epidemiologico. Attualmente, a causa della rapida insorgenza di mutanti farmaco-resistenti di *Mycobacterium tuberculosis*, questa malattia desta preoccupazione. I metodi attualmente disponibili per la determinazione della farmaco-resistenza presentano alcuni svantaggi. Il metodo proporzionale, approvato dal NCCLS, è un saggio semplice e poco costoso. Tuttavia, la sensibilità può essere determinata solo dopo 3 settimane di incubazione. Il metodo radiometrico che prevede l'utilizzo del Bactec, produce risultati entro 5-10 giorni, ma comporta rischi aggiuntivi quali la manipolazione di radioisotopi. L'uso di altre tecniche come l'identificazione dei geni che conferiscono resistenza nei confronti di farmaci antitubercolari, non è sempre possibile in quanto richiede personale specializzato. Abbiamo analizzato l'utilità di un metodo colorimetrico basato sulla riduzione del sale di tetrazolio XTT [2,3-bis (2-metossi-4-nitro-5-sulfonil)-5-(fenilamino)carbonil-2H tetrazolio] per testare la sensibilità di isolati clinici di *M. tuberculosis* all'isoniazide, rifampicina e streptomina. Con l'impiego di XTT la sensibilità alla rifampicina viene determinata dopo 3 giorni di incubazione, mentre sono richiesti 6 e 8 giorni per la determinazione della sensibilità rispettivamente a streptomina e isoniazide. Inoltre rispetto ad altri metodi colorimetrici, quali per esempio quello basato sull'impiego di MTT, la cui determinazione prevede la lisi cellulare, la riduzione di XTT porta alla formazione di un prodotto solubile per la cui determinazione quantitativa non sono necessari ulteriori trattamenti con solventi chimici e consente la determinazione della sensibilità e resistenza alla maggior parte dei farmaci antitubercolari. I risultati ottenuti confermano la validità del metodo colorimetrico per la determinazione rapida della antibiotico-resistenza negli isolati clinici di *M. tuberculosis*. Inoltre, presenta significativi vantaggi rispetto alle altre tecniche disponibili sotto il profilo economico e la sua semplicità di esecuzione ne consente l'impiego anche in Paesi in via di sviluppo nei quali è localizzato il maggior numero di persone affette da tubercolosi.

P117

CONSIDERAZIONI SULL'USO DELLA PCR NELLA DIAGNOSTICA TUBERCOLARE DI MATERIALI NON RESPIRATORI

Santoro G., Falca M., Sabatino R., Cione P.

UOC Microbiologia - Dipartimento di Medicina di Laboratorio ed Anatomia Patologica
A.O. Monaldi Via L.Bianchi Napoli

Obiettivi Scopo del lavoro è stato valutare l'opportunità di

effettuare la ricerca di *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC), utilizzando la tecnica di amplificazione genica in PCR, anche per i materiali di provenienza non respiratoria, pur se essa è validata esclusivamente per i materiali respiratori. Nell'anno 2003, abbiamo analizzato, 161 campioni di provenienza non respiratoria (129 liquidi pleurici e 30 campioni di pus, biopsia o tessuto linfonodale, liquido pericardico e urine) per la diagnosi rapida di tubercolosi.

Metodologia Tutti i campioni non respiratori sono stati sottoposti ad esame batterioscopico diretto per la ricerca di bacilli alcol-acido resistenti, a valutazione diretta in PCR del *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) e ad esame culturale.

Un'aliquota del campione decontaminato è stata sottoposta ad amplificazione genica in PCR per la determinazione qualitativa di *M. Tuberculosis complex* con il sistema Cobas Amplicor della Roche che prevede l'uso di una strumentazione automatica per l'amplificazione e la rivelazione. In quest'ultimo caso, qualora non saggiati nelle 24h, i campioni sono stati congelati a -80°C. In tale metodica è sempre stato utilizzato un controllo interno intralaboratorio oltre ai controlli positivo e negativo proposti dalla ditta produttrice; i campioni che, alla prima determinazione, hanno mostrato la presenza di inibitori, sono stati diluiti 1:2 o 1:5.

Le colture positive sono state identificate con sonde costituite da DNA a catena singola complementare di una sequenza nucleotidica del genoma batterico che è specie-specifica (rRNA) ed è coniugata ad un marcatore chemiluminescente (Accuprobe Biomerieux).

Risultati: Correlando la positività del test di amplificazione alla positività culturale per MTC abbiamo osservato che dei 14 campioni risultati positivi all'amplificazione genica solo 9 trovavano conferma della positività nell'esame batterioscopico diretto o nell'esame culturale mentre 5 si associavano ad esame batterioscopico diretto ed esame culturale negativo. Di contro, abbiamo osservato solo 4 campioni che associavano amplificazione genica negativa ed esame culturale positivo per MTC.

Conclusioni I risultati su esposti, in una valutazione costi/beneficio, ci inducono a proseguire in tale direzione; infatti nel 50% dei casi esaminati è stato possibile fare diagnosi di tubercolosi nell'arco delle 24-48h. Ci pare altresì opportuno ripetere queste valutazioni alla luce di un maggior numero di campioni e nell'ambito di campioni omogenei.

P118

VALUTAZIONE DEL SISTEMA BD PROBETEC ET PER LA DIAGNOSI RAPIDA DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX

Zara F.¹, Troupioti P.², Brerra R.¹, Migliavacca R.¹, Nucleo E.¹, Spalla M.¹, Cardillo A.³, Giacobone E.³, Asticcioli S.¹, Pagani L.¹, Romero E.¹

¹Dip. SMEC-Sez. Microbiologia, Università di Pavia

²Lab. An. Chim. Clin. e Microbiologia, AO "E. Morelli", Sondalo (SO)

³Serv. An. Microb. IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Obiettivi valutare l'utilità, la sensibilità e la specificità del sistema molecolare automatico BD ProbeTec ET (DTB) (Becton Dickinson) in parallelo con i metodi diagnostici tradizionali ed il sistema automatico Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson).

Metodologia 132 campioni respiratori, raccolti da pazienti ospedalizzati ed ambulatoriali presso l'Azienda Ospedaliera "E. Morelli" di Sondalo nel periodo Settembre-Novembre 2002 e selezionati in base al sospetto clinico di TBC, sono stati valutati mediante esame batterioscopico, coltura in Lowenstein-Jensen e MGIT 960, dopo decontaminazione

con NALC-NaOH, in parallelo con il test DTB secondo le istruzioni d'uso.

Le colture dei campioni risultati negativi al test DTB sono state sottoposte a LiPA Mycobacteria (Innogenetics) per l'identificazione dei MOTT.

Risultati Dei 132 (128 escreti) campioni respiratori, 93 (71 positivi allo striscio) sono risultati positivi per *M. tuberculosis* complex (MTC) all'esame colturale; 88/93 (95.7%) campioni erano DTB positivi. Il DTB ha identificato MTC in 67/68 (98.5%) campioni con striscio e coltura positiva e in 22/25 (88%) campioni con striscio negativo e coltura positiva. Dei 33 campioni con coltura negativa, 28 (84.8%) sono risultati DTB negativi. 6/132 campioni, risultati successivamente positivi per MOTT all'esame colturale, erano DTB negativi. Solo 1 dei 132 campioni con coltura MTC-positiva risultava inibito al test. La sensibilità del test DTB su campioni respiratori è stata del 95.7%, la specificità del 84.8%, la likelihood ratio (LR) positiva di 6.32, LR negativa di 0.05.

Conclusioni Il test DTB offre un approccio rapido ed attendibile per la ricerca diretta di MTC da campioni respiratori, in aggiunta all'esame colturale.

P119

INFEZIONE DA CLADOPHIALOPHORA CARRIONII IN MADAGASCAR : ESPERIENZA PRELIMINARE.

Bruno R.*; Sanlorenzo M.*; Lasagna C.*; Cucchi L.*; Caldera D.*; Crema F.*; Defilippi S.*; Grosjean P.***; Rajeamirimoelisoa C.***

* A.S.L. 7 Chivasso (To)

° Equipe Sanitaria Ospedale "S. Croix" Isoanala (Madagascar)

*** Istituto "Pasteur" di Antananarivo (Madagascar)

Introduzione: *Cladophialophora carrionii* è responsabile di cromoblastomicosi ed è endemica in Madagascar, in particolare nel sud dell'isola.

Materiali e metodi: Da maggio a settembre 2003 presso l'ospedale St. Croix di Isoanala (sud Madagascar) 4 pazienti (tre uomini e una donna, età media 41,5 anni, range 31-54) con lesioni cutanee sospette per cromoblastomicosi sono stati sottoposti a:

- esame microscopico diretto di squame cutanee per ricercare i corpi sclerotici tipici della malattia
- prelievo biotipico multiplo (tre frammenti) per esame istopatologico mirante alla definitiva diagnosi
- esame colturale con identificazione del micete responsabile dell'infezione.

L'esame microscopico diretto e la semina su Sabouraud + cloramfenicol + gentamicina sono eseguiti a Isoanala, i successivi accertamenti diagnostici sono effettuati presso l'Institut Pasteur de Madagascar a Antananarivo.

Risultati: In tutti i 4 casi sono stati evidenziati, nei prelievi biotipici, i caratteristici corpi sclerotici; l'esame colturale ha dato esito dubbio in un caso, ma in 3 soggetti ha portato all'isolamento di *Cladophialophora carrionii*.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a terapia sistemica con terbinafina: 250 mg x2/die per due mesi e 250 mg/die per ulteriori sei mesi.

Durante il trattamento un monitoraggio mensile dei più significativi parametri ematochimici non ha evidenziato alterazioni, né si è verificata intolleranza farmacologica.

Nelle 3 forme verrucose-granuleggianti si è avuta una notevole regressione delle lesioni con completa guarigione clinica in 2 pazienti. Nella forma nodulare si è avuta una riduzione volumetrica delle lesioni senza guarigione completa,

per cui si è deciso di prolungare la terapia.

Conclusioni: La terbinafina ha dato ottimi risultati con nessun effetto collaterale; in mancanza di protocolli standard internazionali, occorre attentamente valutare la durata del trattamento in base all'estensione e alla forma clinica della malattia.

P120

"CASE REPORT" DI INFEZIONE DA NOCARDIA ASTEROIDES

Cava M.C.¹, Trequattrini T.², Cappiello G.¹, Magnanti M.¹, Malgrande A.¹, Fumagalli G.², Rivitti R.², Spanò A.¹

¹Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia -

²Struttura Complessa di Pneumologia Clinica

Ospedale "Sandro Pertini", ASL Roma B

La nocardiosi polmonare è un evento poco frequente, spesso non riconosciuto sia a livello clinico che microbiologico. Trattasi generalmente di una infezione opportunistica, ma può essere riscontrata anche in pazienti immunocompetenti. Dal giugno 2002 a dicembre 2003 nell'ambito della diagnostica di laboratorio delle micobatteriosi polmonari con il sistema fluorimetrico MGIT sono stati identificati Actinomiceti aerobi debolmente acido resistenti in 11 pazienti, pari a 1.8% dei soggetti esaminati. Solo in due pazienti, afferenti al Day-Hospital di Pneumologia, è stato possibile correlare il riscontro microbiologico alla sintomatologia clinica: un caso con patologia ostruttiva negativo radiologicamente ma con tosse ed escreato purulento persistente, l'altro caso con infiltrato polmonare sottoclaveare.

Gli escreti (almeno tre per paziente) inoculati, dopo opportuno procedimento di decontaminazione, in terreno liquido fluorimetrico MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) e processati dal sistema automatico BACTEC MGIT 960, sono risultati positivi per Actinomiceti aerobi debolmente acido resistenti (colorazione di Ziehl-Nielsen modificata). La subcoltura in terreno agarizzato al 5% di sangue di montone ha mostrato tipiche colonie stellate, tenacemente adese al terreno e dal caratteristico odore.

Tutti i campioni di escreato esaminati relativi ai due pazienti hanno confermato l'infezione ed in un caso l'esame batterioscopico ha evidenziato la presenza di batteri ramificati debolmente acido resistenti.

Dopo terapia antibiotica specifica le colture sono risultate negative e la sintomatologia clinica è regredita.

P121

RILEVAMENTO DI SNP NEL CODONE 464 DEL GENE *ERG11* IN *CANDIDA ALBICANS*, MEDIANTE PYROSEQUENCING

*Orrù G., *Ciusa M.L., *Pusceddu G., *Montaldo C., *Casentino S., *Pisano B., *Meroni E., *Piras V., *Fadda M.E.

*O.B.L. (Oral Biotechnology Laboratory) Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche Università degli Studi di Cagliari.

*Dipartimento di Biologia Sperimentale, Sezione di Igiene Università degli Studi di Cagliari.

*BIOSENSE S.r.l. Cinisello Balsamo- MI

Gli antifungini azolici rappresentano un'importante classe di farmaci utilizzati nelle infezioni da *C. albicans*, mutazioni

presenti lungo il gene *ERG11*, che codifica per una citocromo P450 monossigenasi, coinvolta nella sintesi dell'ergosterolo, sono state associate all'azolo-resistenza.

In questo lavoro è stata utilizzata la tecnica Pyrosequencing™ per stabilire se esistano differenze in un frammento del gene *ERG11* tra ceppi ketoconazolo-sensibili e ketoconazolo-resistenti di *C. albicans*.

Sono stati analizzati 48 ceppi isolati dalla mucosa orale di soggetti affetti da candidiasi oro-faringea. La sensibilità al ketoconazolo è stata determinata con la tecnica delle microdiluizioni in piastra secondo le direttive del NCCLS. 15 ceppi sono risultati SDD (Sensibilità Dose Dipendente) o resistenti al ketoconazolo con valori di MIC compresi tra 0,25 e >16 µg/ml. Dopo amplificazione tramite PCR con un primer biotinilato di un frammento del gene *ERG11* (dal codone 464 al 483), è stata eseguita la separazione del singolo filamento con un metodo a base di sfere ricoperte con streptavidina. Il sequenziamento ha richiesto sistema e procedure della Pyrosequencing (Pyrosequencing AB Uppsala, Sweden). Durante la reazione di sequenza per ogni base nucleotidica incorporata viene emessa radiazione luminosa grazie ad un sistema enzimatico contenente luciferina, il metodo utilizzato è in grado di eseguire 96 esami/5 ore.

Tra gli isolati clinici di *C. albicans* sono state rilevate mutazioni a carico del codone Gly464Ser (4 ceppi), questi dati sono in accordo con quanto descritto in letteratura. La metodica utilizzata può rappresentare un sistema efficace per l'esecuzione dell'antibiogramma molecolare nella diagnosi di laboratorio di infezione per *C. albicans*.

Ringraziamenti: Dott. Carlo Farachi (BIOSENSE S.r.l.)
Dott. Roberto Usai (DEPECO S.r.l.)

P122

FUNGURIE NEI PAZIENTI OSPEDALIZZATI: INDAGINE RETROSPETTIVA MULTICENTRICA

Faggi E.¹, Farina C.², Lombardi G.³, Andreoni S.⁴, Manso E.⁵, Faggi P.⁶, Nicoletti P.⁷, Pini G.¹, Brigante G.³, Verna G.⁵

¹Dipartimento Sanità Pubblica - Università di Firenze,

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

³Ospedale di Circolo e Università dell'Insubria - Varese,

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

⁵A.O. Umberto I - Ancona,

⁶P.O. Ospedale Spirito Santo - Pescara,

⁷A.O. Careggi - Firenze

In seguito alle numerose segnalazioni dell'aumento, in ambiente ospedaliero, delle infezioni micotiche delle vie urinarie è stata fatta un'indagine multicentrica retrospettiva sull'incidenza delle fungurie in sei centri ospedalieri italiani (Bergamo, Novara, Varese, Firenze, Ancona, Pescara). L'indagine riguarda il periodo gennaio 2001 - dicembre 2002 ed ha avuto lo scopo di precisare la frequenza di isolamento di miceti nelle urinocolture, la distribuzione delle fungurie in base ai reparti, gli agenti eziologici e l'incidenza di fungemie in pazienti con funguria.

Sono stati isolati microrganismi (batteri o funghi) nel 21% delle urinocolture (oltre 100.000 colture): il 2% delle colture risultarono positive per miceti, mentre il 19% per batteri. Miceti furono isolati nell'8% delle urinocolture positive.

Le fungurie sono state osservate soprattutto nei reparti di terapia intensiva (24% delle urinocolture positive), meno frequentemente invece nei reparti chirurgici e medici.

Candida albicans è la specie maggiormente isolata (63% degli stipti), seguita da *C. glabrata* (18%), *C. tropicalis*

(9%), *C. parapsilosis* (3%); saltuariamente sono state isolate altre specie di *Candida* e rari stipti di *Trichosporon asahii* (3) e *Saccharomyces cerevisiae* (1); non sono mai stati ritrovati funghi miceliali.

Le urinocolture positive per lieviti provenivano da pazienti con età media di 66 anni e di sesso prevalentemente femminile.

Il 5% dei pazienti con funguria presentò fungemia. La specie isolata dal sangue fu la stessa di quella isolata dalle urine nel 75% dei pazienti; nel 25% furono isolate specie differenti. Le candidemie associate a candidurie si osservarono soprattutto nei reparti chirurgici.

C. albicans fu la specie maggiormente isolata da pazienti con fungemia e funguria, seguita da *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

P123

ASPERGILLOSI INVASIVA IN PAZIENTE SOTTOPOSTA A TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO ALLOGENICO.

Farris A.G.* , Caddeu R.* , Podda G.S.* , Vacca A**.,

* Laboratorio Analisi Ospedale "R. Binaghi",

Via Is Guadazzonis 14, 09100 Cagliari

** Centro Trapianti Midollo Osseo P.O. "R. Binaghi",

Via Is Guadazzonis 14, 09100 Cagliari

Introduzione. A decorrere dagli anni '70 l'incidenza dell'aspergillosi invasiva è andata progressivamente aumentando. L'inalazione di spore di *Aspergillus* (muffe ubiquitarie) può risultare molto comune, ma la malattia è relativamente rara. L'inalazione di aria contenente spore di *Aspergillus* (il 90% è rappresentato da *A. fumigatus*) è una delle cause principali delle infezioni polmonari nei pazienti immunocompromessi o neutropenici (leucemici, trapiantati d'organo, ..). Nonostante l'introduzione di nuovi ed efficaci farmaci antimicotici, l'aspergillosi invasiva ha molto spesso esito fatale (mortalità del 50 - 100 % dei casi).

Per questo motivo le misure preventive rivestono un ruolo di importanza primaria nel controllo di questa patologia e richiedono una piena conoscenza dell'epidemiologia di questa malattia.

Caso clinico. Viene riportato un caso clinico che è esemplificativo della multifattorialità presente nell'insorgenza e condizionante il decorso dell'aspergillosi invasiva.

Una donna di 35 aa. affetta da Sindrome Mielo Displasica viene sottoposta in data 07/07/2003 a trapianto di midollo osseo allogenico da donatore familiare HLA-identico. Il trapianto ha esito positivo con attecchimento allogenico completo.

Tre giorni dopo la dimissione compare GVHD di II° grado con interessamento cutaneo e intestinale con iperpiressia, diarrea, vomito per cui viene nuovamente ricoverata. Dopo 3 gg di terapia antibiotica scompare l'iperpiressia mentre compare un aumento della bilirubina (B.T. 2 mg/dl), indice di probabile GVHD epatica che dopo 9 gg aumenta a B.T. 3.3 mg/dl. Contemporaneamente si ha aumento di AST e ALT, si positivizza il CMV-DNA quantitativo, si aggrava la diarrea, compare dispnea con modesta ipossiemia. La colonscopia e la biopsia intestinale evidenziano una colonscopia acuta compatibile con una GVHD acuta. Il quadro complessivo depone per una GVHD di grado IV° per cui si intensifica la terapia con ATG (siero antilinfocitario) e Basilimax (anticorpo monoclonale contro il recettore dell'interleuchina 2).

Dal 23/08 si osserva un peggioramento del quadro addominale e di quello respiratorio. Dal 25/08 compare ipoestesia all'emiviso dx associato a parestesie. La RMN evidenzia lesioni focali multiple (Ø 1-2 mm) presenti in entrambi gli

emisferi cerebrali. La pz. viene trattata con ambisome e voriconazolo.

Si ha un peggioramento della GVHD epatica (Bil.Tot. = 29 mg/dl) e intestinale; compare lieve iperpiressia (37,9 °C). Contemporaneamente compare ileo paralitico e insufficienza respiratoria che determina il decesso della paziente.

La pz è stata sottoposta per tutto il periodo della malattia a terapia antibiotica (levofloxacin, meropenem, teicoplanina), antivirale (aciclovir, ganciclovir), antimicotica (fluconazolo, voriconazolo), immunosoppressiva (ciclosporina, urbason, ATG, Basilimax).

Materiali e metodi. Numerosi campioni di espettorato, di feci, di tamponi faringei e nasali, e di emocolture sono stati inviati durante il ricovero della pz. in Laboratorio per le ricerche microbiologiche di routine. Tuttavia solo dai campioni di espettorato e di feci inviati in data 28/08/03 nelle piastre contenenti agar destrosio Sabouraud con CAF dopo 48 ore a 37°, si sono sviluppate colonie piatte, polverose che hanno assunto un colore grigio fumo. L'esame microscopico è stato eseguito utilizzando il metodo del "Vetrino con nastro adesivo": l'osservazione microscopica ha evidenziato una disposizione colonnare delle teste conidiali con vescicole semisferiche da cui si dipartivano una sola fila di fialidi regolari; i conidi si presentavano globulari e rugosi. Pertanto sulla base dell'aspetto macroscopico e delle caratteristiche microscopiche si è posta diagnosi di *Aspergillus fumigatus*.

Il monitoraggio ambientale dell'aria è stato effettuato con campionatore d'aria "SAS Super 90" P.B.I. seguendo il protocollo operativo indicato dalle stesse Ditta.

Risultati e conclusioni. Il caso descritto è esemplificativo della concomitanza di più fattori di rischio presenti nell'insorgenza della aspergillosi invasiva che possiamo così sintetizzare:

1. fattore estrinseco: durante il periodo cui si riferisce il caso clinico descritto, nel terreno adiacente all'ospedale è stato effettuato uno sbancamento. Il monitoraggio ambientale dell'aria sia nelle stanze di degenza ordinaria del CTMO (dove si trovava la pz) sia all'esterno del P.O. ha evidenziato la presenza di *aspergillus fumigatus* in carica elevata.
2. fattore intrinseco: la paziente presentava una marcata neutropenia, una GVHD di IV grado, ed è stata sottoposta a terapia immunosoppressiva con ATG (siero antilinfocitario) e Basilimax (anticorpo monoclonale IL2-R).

Sulla base degli accertamenti ambientali ed in conseguenza del caso clinico sopra riportato sono state predisposte le seguenti procedure:

1. chiusura temporanea e bonifica del reparto;
2. installazione di un sistema di filtrazione dell'aria con filtri HEPA e U.V. non solo nelle camere sterili, dove erano già presenti, ma anche nelle stanze di degenza ordinaria;
3. effettuazione di un più stretto monitoraggio dell'aria confinata;
4. predisposizione di tests diagnostici più precoci per rilevare infezioni di tipo micotico.

P124

RHODOTORULA IN ASCESSO CORNEALE

Giardini F., Machetta F.*, de Sanctis U.*, Pollino C.

Laboratorio Analisi, Direttore: D. Poncini,

Ospedale Oftalmico "G. Sperino", Torino

*Clinica Oculistica dell'Università di Torino,

Direttore: F.M. Grignolo,

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Via Juvarda 19, 10128 Torino

Paziente di anni 60 affetto da ipertensione arteriosa, NIDDM e glaucoma malformativo in OO. Sottoposto nel 1986 in OD

ad enucleazione per glaucoma maligno ed esiti di endoftalmite. Nel 2003 era effettuato in OS un trapianto di cornea a scopo terapeutico per ascesso corneale da *Candida albicans* resistente alla terapia antimicotica locale e sistemica. A 4 mesi dall'intervento si sviluppava in corrispondenza del lembo innestato un'infezione da *Rhodotorula*. Dal prelievo corneale erano eseguite diverse semine:

1. su Agar Cioccolato con arricchimento
2. su Agar Haemophilus (incubato in microaerofilia)
3. su Sabouraud Dextrose Agar
4. in brodo Hemolyne difasico*

*(questo brodo, correntemente usato per le emocolture, è stato da noi adottato anche in caso di infezioni oculari a prognosi severa (panoftalmite, endoftalmite, ulcere corneali gravi) poiché nel corso degli anni abbiamo potuto constatare che in questi casi clinici, normalmente già ampiamente trattati con antibiotici, spesso risulta l'unico terreno che consente uno sviluppo culturale in vitro).

Dopo 72 ore d'incubazione in termostato a 37°C tutti i terreni di coltura solidi davano esito culturale negativo. Faceva eccezione il brodo Hemolyne, che presentava una debolissima torbidità. In 4° giornata il brodo si positivizzava nettamente. Al microscopio, con colorazione al Lactophenol Cotton Bleu, alcune cellule presentavano una tipica morfologia allungata con gemmazione bipolare.

La successiva subcoltura da brodo su una nuova piastra di Sabouraud Dextrose Agar dava esito positivo, con discreta pigmentazione rosacea delle colonie sviluppatesi, che pertanto si identificavano come lieviti appartenenti al genere *Rhodotorula*.

Si allestiva immediatamente un antimicogramma su piastre di RPMI Agar con il metodo E-Test. Gli antimicotici saggiati erano: Fluconazolo, Amfotericina-B, Ketoconazolo, Itraconazolo, 5-Fluorocitosina. La risposta culturale all'antimicogramma era completamente negativa. Ciononostante veniva comunque instaurata una terapia locale con Amfotericina-B e con Iodopovidone. Dopo un iniziale miglioramento del quadro clinico si assisteva ad un nuovo peggioramento dello stesso e pertanto si effettuava un intervento di cheratectomia a scopo diagnostico e terapeutico associata a ricoprimento congiuntivale.

P125

CASE REPORT:

INFEZIONE DA *ALTERNARIA INFECTORIA* IN UN PAZIENTE TRAPIANTATO DI CUORE.

Lo Cascio G (1); Maccacaro L (2); Rizzonelli P(2); Fontana R(2).

¹Servizio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera di Verona

²Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Verona

L'aumento del numero di trapianti d'organo comporta anche l'aumento dei pazienti immunodepressi esposti al rischio di sviluppare infezioni micotiche opportuniste che richiedono al laboratorio di microbiologia diagnosi un tempo non comuni.

Case report. T.M., paziente di 49 anni trapiantato di cuore dopo circa un anno dall'intervento manifestò la comparsa di lesioni nodulari multiple ad entrambi gli arti inferiori; non erano presenti né febbre né dispnea. L'esame istologico eseguito sulla biopsia di una lesione mostrò strutture lievitoformi e ife all'interno di un processo granulomatoso.

Materiali e metodi. Le indagini culturali portarono all'isolamento di colonie giallo-biancastre con reverse verde oliva che al vetrino mostravano ife settate con pigmento melaninico

senza presenza di conidi. Questi ultimi comparvero solo dopo tre settimane su corn meal agar. Mediante PCR e tipizzazione del DNA il fungo fu identificato come *Alternaria infectoria*.

Risultati. Solo cinque casi di infezioni umane dovute ad *Alternaria infectoria* sono riportati in letteratura. In questo caso l'utilizzo della biologia molecolare ha permesso una rapida e corretta identificazione del microrganismo responsabile consentendo al laboratorio di effettuare il saggio di sensibilità agli antimicotici secondo i criteri forniti dall'NCCLS M38-A e di fornire al clinico in tempi utili informazioni per impostare la terapia adeguata.

P126

ISOLAMENTO DI *RHIZOPUS ORYZAE* DA FERITA CHIRURGICA: CASO CLINICO

Manchia P., Porcu F., Cossu A., Terrosu L., Bitti A..

U.O. Microbiologia - Presidio Ospedaliero, Ozieri (SS)

Introduzione: *Rhizopus oryzae* è un micete filamentoso ubiquitario appartenente alla famiglia delle Mucoraceae di interesse clinico perché causa di occasionali severe infezioni, spesso fatali nell'uomo. Di solito si tratta di infezioni mucocutanee, rinocerebrali, genitourinarie, gastrointestinali, polmonari e disseminate in pazienti immunocompromessi.

Caso clinico: una paziente di 42 anni accusa forti dolori addominali; ricoverata in ginecologia gli viene praticata una laparoscopia esplorativa che evidenzia una peritonite stercoracea da rottura di diverticolo intestinale.

Nel decorso post operatorio si rendono necessari due ricoveri in terapia intensiva per febbre elevata non controllabile con le terapie antibiotiche e un secondo intervento per un versamento nel Cavo del Douglas; la ferita chirurgica resta aperta e presenta chiari segni di infezione ed infiltrazione ed un andamento torpido.

Materiali e metodi: tutti campioni clinici della paziente (emoculture, un liquido peritoneale ed un catetere in succulvia) processati per germi aerobi, anaerobi e miceti risultano negativi. Dalla coltura del campione prelevato intraoperatoriamente, durante il secondo intervento, si isola *C. albicans* ed *Enterococcus casseliflavus* (gruppo D). Quest'ultimo germe risulta sensibile solo a Teicoplanina, Vancomicina e Tetraciclina. Dai prelievi di tessuto necrotico della ferita chirurgica aperta si isola il *Rhizopus oryzae*. I campioni erano stati seminati in brodo di arricchimento Nutrient broth (Microbiol) e su Brodo Sabouraud (Biomérieux). Dalle subcolture su agar Sabouraud si osserva una rapida e florida crescita di colonie bianche puntinate di nero ed a fine tessitura cotonosa e fioccosa. L'osservazione microscopica evidenzia caratteristici rizoidi e gli sporangiofori fortemente ramificati e dai clamidocidri ellissoidali e cilindrici. L'esame microscopico diretto dei campioni biotici di tessuto necrotico, prelevato dalla ferita, che appariva ricoperta da una diffusa essudato "fioccoso", evidenziava un infiltrato di leucociti in disfacimento e di aggregati di ife non settate.

Risultati: la conferma della presenza di *Rhizopus* spp. su diversi campioni, in paziente in trattamento con Econazolo per via sistemica, ha richiesto il trattamento con Anfotericina B per via locale associato ad un accurato curettage giornaliero della ferita. L'efficacia del trattamento è stata confermata dalla negativizzazione delle colture, dalla cicatrizzazione della ferita e dal miglioramento del quadro generale.

Conclusioni: l'isolamento di *Rhizopus oryzae* da ferita chirurgica è una evidenza rara in particolare in un paziente senza patologie predisponenti. Il tipo di intervento, le condizioni generali della paziente, l'ampia ferita, possono avere

favorito la localizzazione del micete peraltro considerato un "ambientale". La tempestività della diagnosi e del trattamento hanno evitato la probabile diffusione dell'infezione data la pericolosità del germe.

P127

UN CASO DI SINDROME VERTIGINOSA CAUSATA DA MUCORMICOSI AURICOLARE IN PAZIENTE IMMUNOCOMPETENTE

Boghi G., Floris B., Masala L.

Servizio di Medicina di Laboratorio
P.O. "G.P. Delogu" di Ghilarza - ASL 5 Oristano

Scopo del lavoro: descrizione di un caso di sindrome vertiginosa causata da mucormicosi auricolare in un paziente immunocompetente.

Caso clinico: uomo di 32 anni che da oltre un anno lamenta otodinia e otorrea, il quale ha già eseguito tre visite ORL senza ottenere nessun miglioramento nonostante le terapie prescritte. Riferisce, inoltre, l'insorgenza da circa dieci mesi di una sindrome vertiginosa trattata con farmaci anti-chinetosici e cinnarizina senza grandi benefici. Anamnesi negativa per disturbi metabolici, immunodepressione o etilismo. Nel condotto uditivo esterno si evidenziava una lesione dalla quale, con lieve raschiamento, si poteva asportare del materiale di colorito nerastro.

Metodica e risultati: i tamponi auricolari sono stati seminati sui seguenti terreni di coltura: AS, MacConkey, SM, AC e agar Sabouraud e incubati a 37°C per 24 ore. Solo sulle piastre di Sabouraud si notava la crescita di colonie biancastre, a tessitura lanuginosa bassa, con verso pallido che dopo 48 ore di incubazione mostravano una colorazione grigio-bruno scuro. La preparazione con nastro adesivo e la coltura su vetrino hanno consentito di osservare la presenza di grandi ife nastriformi, non settate, rizoidi poco sviluppati, sporangi globosi, grigio-bruni e sporangiospore ovalari, ialine o brune, spesso striate.

Conclusioni: gli aspetti macroscopici e microscopici osservati erano compatibili con una mucormicosi, infezione sostenuta da miceti appartenenti alla classe degli Zigomiceti.

Il paziente è stato trattato con lavaggi di acido bórico, cortisonici e antibiotici con la scomparsa in pochi giorni della sindrome vertiginosa seguita dopo qualche tempo dalla scomparsa dell'otodinia. Gli esami micologici culturali di controllo hanno dato esito negativo. A 7 mesi dall'episodio il paziente non ha manifestato alcun segno di reinfezione.

La terapia di elezione delle mucormicosi è il trattamento con Anfotericina B, ciò nonostante nel caso sopradescritto, si è dimostrato che il trattamento seguito ha determinato un'ottima risposta, senza esporre il paziente ai ben noti effetti tossici secondari all'uso dell'Anfotericina B.

P128

UN CASO CLINICO: NOCARDIOSI CEREBRALE IN PAZIENTE IMMUNOCOMPROMESSO

*Parisi G., *Minniti R.R., *Pinzi M., *Esposito V., *Paradisi E., *Tronci M.

*Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini Roma
U.O.C. Microbiologia e Virologia-S.S. San Camillo.

Introduzione.

Nocardia asteroides è un batterio Gram positivo aerobio

filamentoso, debolmente alcoolico resistente che si ritrova abitualmente nel suolo.

Scopo del lavoro.

Descrizione di un caso clinico di Nocardiosi cerebrale in paziente immunocompromesso

Caso clinico.

Si riporta il caso di un paziente di 72a affetto da linfoma non Hodgkin che si presenta al pronto soccorso del nostro ospedale per disturbi del visus, stato di confusione e cefalea. Ricoverato in un reparto di medicina, si assiste ad un peggioramento dei sintomi, senso di peso e formicolio, diminuzione della forza al braccio e alla gamba destra, in breve tempo afasia e stato di sopore. TAC e RMN mostrano la presenza di una formazione in sede parietale multiloculata a struttura fluida circoscritta da spesse pareti, di probabile natura ascessuale o eteroplastica. Il paziente presenta un picco febbrile per il quale viene instaurata terapia antibiotica empirica. In considerazione del peggioramento clinico si procede ad un intervento di craniotomia e asportazione della lesione espansiva cerebrale. In sede d'intervento poiché le caratteristiche morfologiche della lesione depongono per una raccolta ascessuale cerebrale viene eseguito un drenaggio chirurgico con invio del materiale purulento al Laboratorio di Microbiologia.

Materiali e Metodi.

L'esame culturale della raccolta ascessuale inviata al Laboratorio di Microbiologia mostrava, dopo 3 giorni d'incubazione, sviluppo su agar sangue e agar cioccolato di colonie di consistenza secca e gessata, grinzose di colore bianco-grigiastre con caratteristico odore pungente di muffa. La colorazione di Gram mostrava forme ramificate Gram positive. La colorazione di Ziehl-Neelsen modificata mostrava forme ramificate debolmente acido alcool resistenti. La positività all'ureasi, l'idrolisi della caseina, la resistenza al lisozima, confermavano la diagnosi microbiologica di *Nocardia asteroides*.

Conclusioni.

Veniva instaurata terapia mirata con Co-trimossazolo e si assisteva ad un miglioramento delle condizioni cliniche del paziente. Sebbene non molto frequente la nocardiosi deve essere presa in considerazione nella diagnosi differenziale di febbre accompagnata da sintomi neurologici nei pazienti immunocompromessi. Un precoce intervento medico e chirurgico ed un accurato referto microbiologico sono determinanti per trattamento adeguato ed un esito favorevole della malattia.

P129

SENSIBILITA' IN VITRO AL FLUCONAZOLO DI ISOLATI VAGINALI DI *CANDIDA* spp.

¹Asticcioli S., ¹Migliavacca R., ¹Nucleo E., ²Spalla M., ¹Zara F., ²Sacco L., ¹Romero E., ¹Pagani L.

¹Dip. S.M.E.C. sez. di Microbiologia, Università di Pavia, via Brambilla 74, 27100 Pavia;

²Servizio Analisi Microbiologiche I.R.C.C.S. "S. Matteo", p.le Golgi, 27100 Pavia.

Obiettivo Scopo dello studio è stato valutare l'attività *in vitro* del fluconazolo, antimicotico ampiamente utilizzato sia per la profilassi che per il trattamento delle infezioni fungine, nei confronti di isolati di *Candida* spp. Le vaginiti da *Candida* rappresentano infatti una patologia in evoluzione per aumento dell'incidenza e comparsa di fenomeni di farmaco-resistenza.

Metodologie Negli anni '00-'03 160 tamponi vaginali sono

stati raccolti da pazienti afferenti all'ambulatorio dell'I.R.C.C.S. S. Matteo di Pavia. I miceti isolati sono stati identificati mediante esame macro e microscopico, terreni selettivi (*Cromalbicans*, Biolife), caratterizzazione del profilo biochimico-metabolico attraverso kit commerciali (API 20 C AUX - BioMérieux) e strumenti automatizzati (VITEK system- BioMérieux) e sono stati testati *in vitro* per la sensibilità al fluconazolo mediante il metodo di microdiluzione in brodo Sensititre YeastOne. I risultati sono stati interpretati tramite i breakpoint di riferimento NCCLS (M27-A).

Risultati I ceppi sono risultati sensibili al fluconazolo nel 65.1% dei casi, sensibili dose-dipendente nel 17.2% e resistenti nel 17.7% dei casi.

La distribuzione della farmaco-resistenza ha rivelato variazioni in rapporto alle specie considerate.

C. albicans, specie isolata nel 51.7% dei casi, ha mostrato elevata sensibilità verso il composto azolico (91%). *C. glabrata*, presente nel 28.9% dei casi, è risultata resistente al fluconazolo con percentuali maggiori (17.3%). Analogamente *C. tropicalis* e *C. krusei*, seppur con risultati diversi.

I ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. lambica* e *Trichosporon* spp. sono risultati sensibili nel 100% dei casi.

Conclusioni. Come osservato in altri studi, la percentuale di ceppi di *C. glabrata* classificati come sensibili dose-dipendenti o resistenti è risultata maggiore di quella rilevata per le altre specie saggiate e l'innata resistenza al fluconazolo di *C. krusei* è stata confermata.

La corretta identificazione a livello di specie assume perciò un'indubbia importanza in quanto a specie differenti è correlata una diversa farmaco-resistenza.

P130

IDENTIFICAZIONE RAPIDA DI INFEZIONE DA MICETI IN CAMPIONI BIOLOGICI: UTILIZZO DI UNA PCR-RFLP

Paglia M.G., Bordi E., Mezzo I., Nebuloso E., Pucillo L.P., Visca P.

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

Le micosi sistemiche rappresentano una delle complicanze più gravi nei pazienti immunocompromessi, nei trapiantati d'organo solido e/o di midollo osseo, nei pazienti oncologici e nei soggetti con AIDS, per i quali le infezioni da *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* costituiscono le patologie fungine più frequentemente riscontrate. I metodi tradizionali per l'identificazione dei miceti includono l'esame morfologico e l'allestimento di saggi biochimici per l'identificazione di specie fungina. Tali sistemi sono laboriosi e talvolta non conclusivi per alcune specie rare. La diagnosi culturale di queste infezioni è tardiva e non di rado è basata sull'esclusione di patologie batteriche o virali. Tale limitazione può essere superata da mezzi diagnostici che forniscano al contempo una rapida individuazione del micete ad una corretta assegnazione tassonomica. I metodi molecolari basati sull'amplificazione dei geni che codificano per gli RNA ribosomali (rDNA) costituiscono un valido strumento di diagnosi: (i) rDNA è sovente multicopie nei genomi microbici e questo rende il sistema più sensibile; (ii) sequenze variabili nel contesto genico conservato (ad esempio dei 18S rDNA) sono utili per il riconoscimento di genere oltre che di specie.

Obiettivo. Applicare e valutare una metodica diagnostica su base genetica mediante PCR-RFLP che consenta l'identifica-

zione diretta di miceti in campioni biologici.

Materiali e Metodi. L'identificazione fenotipica dei miceti isolati dai materiali biologici (4 liquidi cefalorachidiani e 6 campioni respiratori), è stata eseguita con il sistema RapID Yeast Plus System (Remel). Il DNA del ceppo di controllo (*Candida albicans* ATCC 60193), dei 10 campioni biologici e dei corrispondenti 10 isolati clinici (2 *C. albicans*, 2 *C. krusei*, 2 *C. tropicalis*, 1 *C. lusitanae*, 1 *Aspergillus fumigatus*, 2 *Cryptococcus neoformans*) è stato estratto con QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), previa digestione enzimatica. Un tratto del gene codificante il 18S rRNA è stato amplificato con i primers NS5/NS6. Tale sistema di amplificazione ha consentito di rivelare fino a 10 CFU di *C. albicans* (ATCC 60193). I prodotti di PCR (circa 310 bp) sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *HaeIII*.

Risultati e Conclusioni. I risultati ottenuti sui campioni biologici e sugli isolati erano sovrapponibili. Dopo digestione enzimatica si sono ottenuti i seguenti profili di restrizione: *Candida* spp. 2 frammenti (163 e 147 bp); *C. neoformans* 3 frammenti (147, 87 e 76 bp); *A. fumigatus* 4 frammenti (147, 74, 59 e 30 bp). Questi risultati preliminari suggeriscono che la PCR-RFLP, è applicabile alla differenziazione dei 18S rDNA di specie fungine patogene. La metodica, applicata su campioni clinici, si è rivelata di semplice esecuzione ed attendibile e pertanto può essere considerata una valida integrazione ai metodi di identificazione tradizionali.

P131

FUNGEMIA DA *SPOROBOLOMYCES SALMONICOLOR* IN UN OSPITE IMMUNOCOMPROMESSO. PRIMO CASO DESCRITTO IN ITALIA.

Podda R.*, Aresu M.G.*, Consagra M.C.*, Porcu P.P.*, Fiori G.M.*, Sanna M.*

*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia - Ospedale Oncologico "A. Businco" - Cagliari
 •Oncoematologia Pediatrica - Ospedale Regionale per le Microcitemie - Cagliari

Sporobolomyces salmonicolor, un lievito appartenente alla classe degli Urediniomiceti, si trova comunemente nell'ambiente: nell'aria, nel suolo, nelle acque. Il suo habitat naturale comprende anche i mammiferi, gli uccelli e le piante (corteccia delle arance).

In vitro cresce rapidamente sui terreni di coltura con colonie cremose, opache con caratteristico colore rosa-salmone. *Sporobolomyces salmonicolor* può causare molto raramente infezioni nei pazienti immunocompromessi (AIDS, chemioterapici) o nei pazienti con cateterizzazione prolungata; in letteratura sono riportati pochissimi casi negli Stati Uniti.

Caso clinico. Questo caso si riferisce ad una paziente di 23 anni, affetta dal gennaio 2003, da neoplasia a cellule germinali di tipo misto nella regione soprasellare, in terapia immunosoppressiva (secondo protocollo SIOP CNS GCT 96) e cateterismo prolungato.

Ad agosto del 2003 durante un ricovero presentò ipertensione e le venne richiesta un'emocoltura che venne da noi eseguita col sistema Bactec 9240 della B.D.. Dopo 3 giorni lo strumento ci segnalò la positività del campione che venne immediatamente seminato, venne inoltre allestito un vetrino per la colorazione di Gram. Dall'osservazione microscopica si osservò la presenza di miceti. Il reparto di provenienza venne prontamente avvisato e la paziente venne trattata con fluconazolo (6mg/kg/die per 10 gg.). Il giorno successivo, era evidente la crescita su Agar cioccolato e su Sabouraud di colo-

nie rosa salmone. Col sistema API della bioMerieux il micete venne identificato come *Sporobolomyces salmonicolor*. L'antimicrogramma indicò la sensibilità dello stesso alla fluocitosina, all'anfotericina, alla nistatina, al miconazolo, all'econazolo ed al chetoconazolo nonché al voriconazolo ed al fluconazolo.

La paziente durante il trattamento subì un miglioramento del quadro clinico con scomparsa della febbre.

Tuttavia, a distanza di un mese i sintomi si ripresentarono e venne ripetuta l'emocoltura la quale risultò di nuovo positiva. Venne ancora isolato *Sporobolomyces salmonicolor*.

Il trattamento con Ambisone (3 mg/kg/die per 28 gg.) determinò la definitiva guarigione della paziente.

P132

NOCARDIOSI POLMONARE E CEREbraLE IN GIOVANE TRAPIANTATO DI RENE

Grancini A., Ranzi M.L., Lenza A.R., Maraschini A., Perego L., Ghio L.*, Farina C.*

Lab. Centrale Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia IRCCS Ospedale Maggiore - Milano

*U.O Nefrologia, Dialisi e trapianto pediatrico -

Az. Ospedaliera ICP, Milano

°U.O Microbiologia - Az. Ospedaliera Ospedale San Carlo Borromeo, Milano

Introduzione Batteri del genere *Nocardia* sono saprofiti ubiquitari, vivono nel suolo, in substrati organici e nell'acqua. La Nocardiosi è rara ed abitualmente causa infezioni cutanee e sottocutanee, polmonari o disseminate con localizzazioni cerebrali, oculari, ossee, renali e a vari organi e tessuti.

Caso clinico B.G. di 13 anni affetto da uropatia ostruttiva riceve trapianto di rene a giugno 2003, dopo 8 anni di trattamento dialitico. La ripresa funzionale è immediata. Ad agosto 2003 compare febbre intermittente non responsiva a trattamento antibiotico empirico e radiologicamente viene evidenziato un addensamento polmonare. La Tac cerebrale mostra plurime lesioni di probabile natura ascessuale.

Nel novembre 2003 da biopsia polmonare e da broncoaspirato vengono evidenziati previa colorazione bastoncini gram positivi ramificati, isolati successivamente in coltura pura e rivelatisi debolmente alcool-acido resistenti.

Il microrganismo risulta scarsamente sensibile al Trimetoprim/Sulfametossazolo e sensibile al Linezolid e il paziente viene trattato con 600 mg x 2 e successivamente 450 mg x 2 fino al 29 gennaio 2004 con notevole miglioramento del quadro radiologico polmonare e cerebrale. L'anemizzazione marcata e la cefalea importante inducono a sospendere almeno temporaneamente la terapia antibiotica. Dal 5 febbraio il paziente viene trattato con Meropenem 1.5 gr x 3, terapia tuttora in corso. Il microrganismo, inviato Centro Coordinatore ECMM per l'Italia (Dr. Farina), è stato identificato come *Nocardia farcinica*.

Discussione La Nocardiosi è una infezione opportunistica con tendenza ad invadere tutti gli organi e a recidivare a dispetto di una corretta terapia. In pazienti trapiantati di rene ha una incidenza del 2-5 %, con una mortalità stimata del 25% che raggiunge il 42% in caso di coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Nell'80% dei casi, il coinvolgimento polmonare è il segno rivelatore dell'infezione. E' quindi doveroso nelle infezioni polmonari non responsive a terapia antibiotica, allestire un preparato microscopico che ponga il sospetto diagnostico e consenta, prolungando i tempi di incubazione, l'isolamento del microrganismo.

P133

ATTIVITÀ FUNGICIDA DI ANALOGHI CICLICI ISOTIOSEMICARBAZONICI NEI CONFRONTI DI ISOLATI CLINICI DI *CANDIDA* SPP.

Saddi M.^a, Borgna R.^a, Cardia M.C.^b, Sanna C.^a, Saddi B.^c, Sanna A.^a, Maccioni E.^b, De Logu A.^a

^aSezione di Microbiologia Medica, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Cagliari,
Viale Sant'Ignazio 38, 09123 Cagliari

^bDipartimento Farmaco Chimico Tecnologico,
Università di Cagliari

^cLaboratorio di Analisi Ospedale SS. Trinità, Cagliari

L'incidenza delle infezioni sostenute da *Candida* spp. è aumentata negli ultimi anni in particolare nei pazienti immunocompromessi e la mortalità rimane elevata nonostante il trattamento con farmaci antifungini tradizionali o con molecole più recenti quali la caspofungina ed altre echinocandine. L'amfotericina B (AMB) rimane il farmaco di scelta per il trattamento delle micosi profonde in considerazione dell'ampio spettro di azione e della potente attività fungicida. Seppure siano state preparate diverse formulazioni lipidiche e liposomiali allo scopo di ridurne la tossicità, il suo impiego clinico è accompagnato dall'insorgenza di effetti collaterali che costringe spesso all'interruzione della terapia. Gli antifungini azolici sono meno tossici dell'AMB ma la efficacia terapeutica non è generalmente soddisfacente, in particolare nel paziente immunodepresso, a causa dello scarso potere fungicida.

Nel tentativo di ottenere nuove molecole con specifica attività antifungina, abbiamo studiato una nuova classe di derivati isotiosemicarbazonici ed analoghi ciclici. La attività *in vitro*, determinata secondo il metodo M27A del NCCLS nei confronti di *C. albicans* ATCC 10231 e di 104 ceppi di *Candida* spp isolati da materiale di provenienza clinica, ha evidenziato valori di MIC e di MCF significativamente inferiori a quelli mostrati da fluconazolo, nistatina e miconazolo e paragonabili a quelli determinati per AMB. In particolare, rispetto al fluconazolo, è stata determinata una attività fungicida a concentrazioni poco superiori a quelle di MIC. Inoltre gli studi di tossicità effettuati su cellule Vero mediante riduzione di sali di tetrazolo, hanno evidenziato valori di CC₅₀ decisamente superiori a quelli dell'AMB e nistatina e sovrapponibili a quelli del fluconazolo. I rapporti CC₅₀/MIC e CC₅₀/MCF determinati per i derivati isotiosemicarbazonici risultano quindi significativamente più favorevoli di quelli determinati per nistatina e AMB. I risultati ottenuti indicano che i derivati isotiosemicarbazonici possono rappresentare un nuovo approccio per lo sviluppo di farmaci per il trattamento delle infezioni sostenute da *Candida* spp.

P134

DESCRIZIONE DI UN CASO DI SPOROTRICOSI CUTANEA

Todisco A., Landi M., Ariola R., Iandoli R.*

Unità Operativa di Virologia

* Unità Operativa di Dermatologia
Azienda Ospedaliera "San G. Moscati", Avellino

Lo *sporothrix schenckii* è un micete dimorfo diffuso in tutto il mondo, pur essendo di più frequente osservazione nelle

regioni tropicali). Sporadicamente casi di malattia sono stati segnalati anche nel centro-nord d'Italia. La localizzazione esclusivamente cutanea è considerata rara. Presentiamo un caso di sporotricosi cutanea di recente venuto alla nostra osservazione.

Caso Clinico

Paziente di 22 anni che, circa 20 giorni prima della nostra osservazione, si era punta al volto con le spine di vegetali. Nei giorni seguenti, per la persistenza della lesione, consultava un sanitario che prescriveva terapia antibiotica sistemica ed antimicotica topica. Dopo 10 giorni non vi era miglioramento. Alla visita si osservava, al lato sinistro del mento, una lesione poco rilevata, lievemente eritematosa, centrata da un'escara. Alla palpazione si apprezzava un nodulo sottocutaneo, di consistenza duro-elastico, di circa due cm. di diametro. L'asportazione dell'escara consentiva il prelievo di materiale purulento che veniva seminato su terreno Agardestrosio-Sabouraud addizionato a CAF; dopo 4 giorni di incubazione a 30°C si sviluppavano colonie sferiche di colore bianco cremoso. L'esame microscopico a fresco, da un prelievo da piastra, mostrava la presenza di ife settate frammentate a conidiofori ifa-simili e conidi globosi, ovali e piriformi-ellittici. Il dimorfismo era rilevato dalla conversione alla forma lievitiiforme dopo trasporto della coltura in Agardestrosio-Sabouraud addizionato a CAF a 37°C. Le cellule lievitiiformi all'osservazione microscopica apparivano rotonde, ovalari e a forma di sigaro. Con l'invecchiamento della coltura, il colore delle colonie tendeva al nero.

Si iniziò a trattare la paziente con 200 mg. al giorno d'Itraconazolo. Dopo tre settimane di terapia la lesione si era ridotta e non era più dolente alla pressione. Si ridusse la dose a 100 mg/di. Al terzo mese di terapia la paziente era guarita in assenza di effetti collaterali. La diagnosi microbiologica e la terapia appropriata hanno consentito la completa risoluzione del caso.

P135

DIAGNOSI INUSUALE DI TRICOCEFALOSI CON L'ESAME UROPARASSITOLOGICO.

Arzese A.¹, Beltrame A.², De Cecco L.², Bragantini F.², Tavio M.², Viale PL.²

¹Cattedra di Microbiologia/Clinica di Malattie Infettive, Policlinico Universitario a Gestione Diretta, Università degli Studi di Udine, Via Colugna n° 50, 33100 Udine

²Clinica di Malattie Infettive Policlinico Universitario a Gestione Diretta, Università degli Studi di Udine, Via Colugna n° 50, 33100 Udine

L'infestazione da *Trichuris trichiura* costituisce una causa frequente di parassitosi intestinale a livello mondiale, con una stima di 700 milioni di persone infestate. L'esame coproparassitologico rappresenta il *gold standard* per la diagnosi di tricocefalosi, permettendo di identificare la tipica morfologia a "vassoio" o "botticella" delle uova. Tale esame è pertanto necessario in caso di sospetto clinico di tricocefalosi: disturbi intestinali o eosinofilia.

Il 23/02/04 un uomo di 38 anni, di nazionalità marocchina è giunto all'attenzione della Clinica di Malattie Infettive per miocardio-pericardite febbrile e sintomatologia respiratoria (tosse secca) confermata dall'esame radiologico (addensamenti bilaterali alle basi polmonari). Il paziente presentava, inoltre, eosinofilia (1800/mL, 15%). L'ultimo viaggio nel paese di origine veniva riferito nell'agosto del 2003. Dopo aver iniziato una terapia antibiotica ad ampio spettro ed eseguito le indagini per una sospetta malattia tubercolare, sono

state effettuate indagini parassitologiche risultate negative per uova di elminti: 1) esame copro-parassitologico su 4 campioni di feci (microscopia diretta e dopo concentrazione/arricchimento mediante sedimentazione con formalina/acetato di etile) 2) metodo di *Baermann* su 4 campioni di feci 3) esame microscopico diretto e dopo concentrazione di 1 aspirato gastro-duodenale 3) indagini sierologiche per *Trichinella* (EIA) (Roma, ISS), *S. stercoralis* (IFAT), *Schistosoma* (IFAT), *Toxocara* (IFAT) ed *Echinococcus* (ELISA, IHA) (Negrar, Verona). L'esame uroparassitologico, effettuato per escludere la presenza di uova di *S. hematobium*, ha permesso di identificare le uova di *T. trichiura* nel sedimento urinario (Foto). Tale riscontro è stato interpretato come contaminazione fecale in soggetto con tricocefalosi asintomatica a bassa carica fecale e miocardio-pericardite acuta di probabile origine virale a rapida risoluzione.

Il reperimento di uova di *Trichuris* nelle urine è riportata in letteratura come rara conseguenza della disseminazione delle uova dalla sede intestinale. Tale evento, sottolinea l'importanza di estendere le indagini parassitologiche al maggior numero di campioni idonei, qualora sussista il sospetto di parassitosi.

P136

PREVALENZA DELLE INFEZIONI PARASSITARIE INTESTINALI IN PAZIENTI IN ETÀ PEDIATRICA: ANNO 2003

Bandettini R., Ricagni L., Orsi A., Ferrari P., Valente V., Facco E., Pescetto L.

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia Istituto Giannina Gaslini, GENOVA.

Introduzione:

Nel nostro Paese le infezioni parassitarie intestinali autoctone sono piuttosto rare, con prevalenza variabile a seconda dell'agente infestante coinvolto.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare le parassitosi intestinali diagnosticate dal nostro Laboratorio Analisi anche alla luce del consolidato flusso migratorio da Paesi in cui tali patologie sono endemiche.

Materiali e metodi:

Nel corso del 2003 sono pervenuti, presso il nostro Laboratorio, campioni di feci appartenenti a 521 pazienti (66.8% ricoverati - 33.2% ambulatoriali) per la ricerca parassitologia. In tutti i campioni sono stati condotti i seguenti esami:

- macroscopico
- microscopico diretto con Lugol
- microscopico dopo arricchimento

Abbiamo inoltre ricevuto 46 (82.6% ricoverati - 17.4% ambulatoriali) richieste specifiche per ricerca ossiuri, eseguita con "Scotch Test".

Risultati:

Dei complessivi 567 campioni, duplicati esclusi, 72 (12,7%) sono risultati positivi per i seguenti parassiti:

- <i>Giardia lamblia</i>	31/567	5,5%
- <i>Entamoeba histolytica</i>	15/567	2,6%
- <i>Enterobius vermicularis</i>	11/567	1,9%
- <i>Entamoeba coli</i>	07/567	1,2%
- <i>Tenia</i> spp. - uova	04/567	0,7%
- <i>Chilomastix mesnili</i>	02/567	0,4%
- <i>Strongyloides stercoralis</i> larva	01/567	0,2%
- <i>Trichuris trichiura</i> - uova	01/567	0,2%
Totale	72/567	12,7%

Conclusioni:

Le infezioni parassitarie intestinali sono presenti nonostante le buone condizioni igienico-sanitarie in cui viviamo; in particolare dall'analisi dei nostri dati si evince che:

- la prevalenza riscontrata è leggermente superiore ai valori riportati in letteratura;
- le protozosi clinicamente significative sono superiori (8,1%) alle elmintosi (3%)
- le 15 infestazioni da *Entamoeba histolytica* sono state riscontrate in 14 bambini provenienti dal Centro America e in 1 giovane adulto italiano che presentava, al ritorno da un viaggio in un Paese Tropicale, un quadro di enterocolite.

P137

LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI DELLE PARASSITOSI INTESTINALI

* Bernieri F.; Casella P.; Crotti D.; Cutrupi V.; Galli D.; Di Matteo L.; Raglio A.

*Comitato di Studio per la Parassitologia dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI-CoSP)

Il Comitato di Studio per la Parassitologia dell'AMCLI si occupa da oltre 10 anni di aggiornamento e diffusione della parassitologia di interesse medico all'interno dell'Associazione, attraverso pubblicazioni e corsi.

La lunga esperienza di corsi di parassitologia sia "di base" che "avanzati" ha permesso al Comitato di entrare in contatto con laboratoristi di tutta Italia e con le loro richieste, prima tra tutte quella di fornire delle indicazioni pratiche per il laboratorista che inizia ad occuparsi di parassitologia e deve scegliere le tecniche diagnostiche da utilizzare.

Da queste numerosissime e pressanti richieste è nata la decisione di pubblicare delle **Linee Guida per la ricerca dei parassiti intestinali, indirizzate al laboratorista, medico, biologo o tecnico di laboratorio, che si occupa di parassitologia.**

Tale lavoro è stato anche motivato dalla mancanza di Linee Guida italiane ufficiali per lo specifico argomento.

Obiettivi

- Aumentare l'efficacia dell'esame coproparassitologico finalizzato alla ricerca dei parassiti intestinali.
- Diffondere l'uso di tecniche idonee ad ottenere i risultati analitici migliori.

Raccomandazioni

- Quali tecniche utilizzare per effettuare un **Esame Coproparassitologico Standard**.
- Effettuare sempre la **Concentrazione** Formolo Etere - Etil Acetato su ogni campione fecale da sottoporre a ricerca dei parassiti nelle feci.
- Effettuare sempre una **colorazione permanente** quale necessario completamento della ricerca dei parassiti nelle feci.
- Conoscere i limiti della Concentrazione e le indicazioni per ricerche mirate di alcuni parassiti (*Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*, *Cryptosporidium parvum*, *Dientamoeba fragilis*).
- Cosa riportare su un referto coproparassitologico.

P138

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI *LEISHMANIA INFANTUM* A CONFERMA DI UN RARO CASO AUTOCTONO DI LEISHMANIOSI LARINGEA.

Casolari C., Pecorari M., Cesinaro A.M. Fabio G., Tamassia G., Sabbatini A.T., Guaraldi G.*, Gherardi V.*, Imparato S.°, Piolini R.°, Rumpianesi F.

Dipartimento Integrato dei Servizi e di Laboratorio

*Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena

°Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Ospedale L.Sacco, Università di Milano

Leishmania infantum risulta raramente diagnosticata come agente di forme mucose autoctone nel nostro Paese. Viene segnalato un caso di leishmaniosi mucosa in un soggetto immunocompetente di 53 anni residente in Abruzzo, ricoverato presso il Policlinico di Modena per una neoformazione laringofaringea e il sospetto di carcinoma. L'esame istologico di uno su tre frammenti biotici evidenziava, oltre ad una diffusa flogosi granulomatosa, la presenza di alcune strutture ovoidali di 1-3 micron di diametro all'interno di cellule istiocitarie, positive alla colorazione di Giemsa, che deponevano per *Leishmania*. Il paziente non presentava adenomegalia né epatosplenomegalia, aveva valori biochimici nei limiti e dichiarava di non avere mai effettuato soggiorni all'estero. La ricerca anticorpale in emoagglutinazione indiretta risultava negativa. La biopsia osteomidollare non evidenziava immagini suggestive per leishmaniosi. Un secondo campione biotico prelevato dalla lesione laringea risultava istologicamente negativo. Sia il primo che il secondo campione venivano sottoposti ad indagine molecolare per confermare il sospetto diagnostico di leishmaniosi. Cellule di *L. donovani* e di *L. infantum* venivano utilizzate come controlli positivi. L'amplificazione dell'acido nucleico mediante nested PCR secondo Noyes (1) confermava la presenza di *Leishmania*. L'identificazione di specie mediante PCR e taglio con enzima di restrizione *Hae* III secondo Minodier (2) portava al riconoscimento di *L. infantum*. Due cicli consecutivi di terapia con amfotericina B liposomiale per 5 giorni consentivano la risoluzione completa del quadro. I risultati ottenuti sottolineano il vantaggio di utilizzare tecniche molecolari nella diagnosi di leishmaniosi, in particolare quando questa si presenta con localizzazioni di raro riscontro. Le forme mucose primitive vanno differenziate da processi neoplastici e forme granulomatose infettive. L'esame istologico non sempre fornisce risultati esaurienti, soprattutto in presenza di una bassa carica parassitaria. L'impiego di una tecnica molecolare sensibile come la nested-PCR associata all'uso di enzimi di restrizione consente in breve tempo una precisa diagnosi differenziale anche a partire da campioni paraffinati.

BIBLIOGRAFIA

1. Noyes et al. J Clin Microbiol 1998
2. Minodier et al. J Clin Microbiol 1997

P139

SIEROLOGIA PARASSITOLOGICA: I LIMITI E L'EFFICIENZA DIAGNOSTICA.

¹Ciarrocchi G., ¹Neri A., ¹Rondello G., ¹Tocchini M., ²Gabrielli O., ²Garbuglia G., ²Mora M., ²Salvatori P.

¹A.O. "Ospedali Riuniti", U.O. Laboratorio Analisi, Settore Sierologia - Ancona;

²U.O. Clinica Pediatrica, Università degli studi di Ancona.

Scopo. Il campo della diagnostica parassitologia spazia dallo studio degli agenti ematici a quelli intestinali ed extra-organici (Amoeba, Giardia, Tenia, Toxocara, ecc.).

I metodi di elezione nella ricerca degli agenti sono tipicamente microbiologici; tuttavia, alcune procedure, dirette e/o colturali, per differenti ragioni, non possiedono livelli soddisfacenti di efficienza diagnostica; in altri casi la ricerca diretta appare addirittura incongrua (Toxocara, Echinococcus).

Con tale intento sono stati valutati alcuni test sierologici nel loro ruolo complementare o sostitutivo delle procedure microbiologiche.

Metodi. Durante l'anno 2003 sono stati esaminati un totale di 483 campioni di siero per la ricerca di anticorpi specifici IgG verso *Toxocara canis* (n=160); *Leishmania* sp. (n=90); *Echinococcus* (n=119); *Entamoeba histolytica* (n=103); *Tenia solium* (n=11).

La ricerca riferita a *Toxocara* è avvenuta su campioni di bambini extracomunitari (età: 1-10 anni) a seguito di controlli sanitari di routine post-adozione. Tutti i bambini erano asintomatici o con modeste alterazioni dell'alvo; rilevante è apparsa la frequenza, in tale popolazione, del riscontro di eosinofilia. Terapia medica a base di Mebendazolo (200mg/die per 5 gg) fu somministrata ai soggetti risultati senza equivoco positivi ai test sierologici, dopo ponderata valutazione clinico-anamnestica. Gli altri agenti parassitari furono ricercati su campioni pediatrici e di adulti, per sospetto clinico o per follow up. L'intero pannello di esami fu eseguito con tests elisa (Alifax-Italia), omogenei per tempi di esecuzione e reagenti. I tests di conferma furono Western-Blot test (FGM-Italia) e IFI (MarDx-Alifax).

Risultati. Dei 160 sieri esaminati per *Toxocara*, 53 (42 pazienti) risultarono positivi; 8/103 furono positivi per *Entamoeba*; 10/90 (3 pazienti) per *Leishmania*; 2/119 per *Echinococcus*; 2/11 per *Tenia*.

Il test WB confermò 49/53 (92.4%) dei sieri positivi per *Toxocara*; 9/10 (90%) per *Leishmania*, dei quali 7 campioni appartenevano ad un unico paziente HIV con leishmaniosi viscerale accertata; 2/2 per *Echinococcus*. Di 8 positivi per *Entamoeba*, solo 3 furono invece confermati con test IFI; 1 caso dei 3 presentava una clinica clamorosa, pur in assenza di riscontro microbiologico diretto. Non furono confermati con WB i 2 sieri per *Tenia*, peraltro risultati positivi a *Toxocara*.

Discussione. Il primo approccio mediante un test elisa nella sierodiagnosi parassitologia risulta nel complesso soddisfacente e di rilevante contributo diagnostico per 3/5 esami valutati. Discutibile appare invece il livello di specificità relativo al test per *Entamoeba*.

Infine, di scarsa appropriatezza appare la richiesta di esami sierologici nel follow up, a causa della lunga permanenza di elevati livelli anticorpali IgG, a fronte di una scarsa disponibilità di test affidabili orientati alla ricerca di IgM e/o IgA specifiche.

P140**DIAGNOSI MOLECOLARE DI
MENINGO-ENCEFALITE AMEBICA PRIMARIA**

Dal Bello F., Tommasini T., Cusinato R., Mengoli C.,
Franchin E., De Canale E.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche
U.O. di Microbiologia e Virologia
Complesso Convenzionato Azienda Ospedaliera -
Università Padova.

Piccole amebe a vita libera, diffuse in tutti i continenti, appartenenti ai generi *Naegleria*, *Acanthamoeba* e *Balamuthia* possono causare infezioni del SNC.

Tradizionalmente la diagnosi di queste infezioni richiede l'identificazione morfologica e/o l'isolamento colturale dei protozoi. In occasione di un recente caso clinico le indagini molecolari hanno dato un contributo determinante all'identificazione di specie del protozoo e hanno confermato il dato microscopico positivo a fronte di un esame colturale negativo per amebe ambientali.

Il caso clinico riguarda un ragazzo deceduto nell'arco di pochi giorni con sintomi di interessamento del SNC che nei giorni precedenti il ricovero si era bagnato nelle acque di un fiume.

Nel mese di luglio dell'anno 2003 è giunto alla nostra osservazione un campione autoptico di materiale cerebrale dopo circa 40 ore dal decesso. Gli esami colturali per batteri e miceti hanno dato esito negativo, come pure le ricerche di micobatteri e virus neurotropi eseguite con indagini colturali e molecolari. Contemporaneamente sono stati allestiti esami colturali per amebe ambientali e preparati per microscopia ottica.

L'osservazione dei preparati colorati al Gram e al Giemsa, oltre ai polimorfonucleati neutrofili, ha permesso di rilevare la presenza di numerosi elementi cellulari che per le loro proprietà morfotintoriali sono stati classificati come trofozoiti di amebe ambientali.

La ricerca colturale di amebe ambientali su terreni xenici è rimasta negativa, mentre il controllo positivo di crescita, costituito da cisti di *Acanthamoeba castellanii* ha dato luogo allo sviluppo di numerosi trofozoiti.

Il DNA genomico è stato estratto da biopsia cerebrale usando un kit QiaAmp (Qiagen, Hilden, Germany). E' stato quindi amplificata la regione completa della Internal Transcribed Unit ribosomiale (ITS) usando due coppie di primers localizzati nelle subunità *small* (SSU) e *large* (LSU) del gene rRNA. Il ceppo del campione in esame ha mostrato un match perfetto (similarità $\geq 99\%$) con le sequenze dei ceppi di *Naegleria fowleri* presenti in GenBank.

L'estate dell'anno 2003 alle nostre latitudini è stata caratterizzata da temperature particolarmente elevate che hanno riscaldato le acque dolci ed hanno creato le condizioni ambientali ideali per la selezione e la moltiplicazione di protozoi termofili come *Naegleria fowleri* in grado di tollerare temperature dai 40 ai 45°C. La larga distribuzione ambientale rende molto probabile il contatto di questi protozoi con l'uomo; pertanto in particolari zone a rischio e nel corso di periodi dell'anno caratterizzati da alte temperature e scarse precipitazioni le autorità competenti sono tenute ad avvisare la cittadinanza di non bagnarsi in acque libere di superficie dolci e poco profonde.

P141**VALUTAZIONE DI UN NUOVO SISTEMA
PER LA CONCENTRAZIONE DEI PARASSITI
INTESTINALI**

De Canale E., Tessari A., Lo Russo L., Campion L.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche
U.O. di Microbiologia e Virologia
Complesso Convenzionato Azienda Ospedaliera -
Università Padova.

Il test Para-Pak SpinCon (Meridian Diagnostics, Inc., Cincinnati, Ohio) è un sistema per la concentrazione dei parassiti intestinali a partire da campioni fecali raccolti in liquido fissativo.

Il test SpinCon è stato progettato per eseguire la concentrazione dei parassiti senza l'utilizzo di sostanze potenzialmente pericolose, ma sfruttando le piccole dimensioni dei parassiti. Il materiale fecale, fissato e trattato con il surfattante, nel corso di un'unica centrifugazione (1800-2200rpm x 10min.) viene lasciato filtrare attraverso 2 griglie metalliche a porosità decrescente e mentre la maggior parte del materiale fecale da eliminare viene trattenuto dalle 2 griglie i parassiti vengono concentrati sul fondo di una provetta conica. Questo nuovo sistema è stato da noi paragonato al tradizionale metodo di arricchimento FEA (formalina-etere/etilacetato); ventiquattro campioni fecali positivi per parassiti intestinali, raccolti in SAF (sodio acetato-acido acetico-formalina), sono stati esaminati in doppio con i due sistemi in modo da verificare il recupero di trofozoiti, cisti, uova e larve di elminti. Tre parassitologi esperti hanno conteggiato il numero totale di parassiti contenuti in aliquote di 10 microlitri di sospensione fecale. Di ogni campione sono state osservate tre aliquote ad alto ingrandimento (400X) con l'ausilio di vetrini coprioggetto di 22x22 mm. ed il numero totale dei parassiti riportato è in realtà la media delle tre osservazioni e dei campioni esaminati.

Vengono di seguito riportati il numero di organismi osservati rispettivamente nei campioni non concentrati (baseline), concentrati mediante FEA e SpinCon: trofozoiti di *Entamoeba histolytica/dispar* 8/10/11; trofozoiti di *Dientamoeba fragilis* 45/50/55; cisti di *Entamoeba coli* 7/10/11; cisti di *Giardia lamblia* 18/45/50; uova di *D. latum* 2/5/5; uova di *Ascaris lumbricoides* 3/6/6; uova di *Schistosoma mansoni* 1/2/2; uova di *Taenia* sp. 33/45/52; uova di *H. nana* 2/4/4; larve di *Strongyloides stercoralis* 1/2/2.

Abbiamo notato nei campioni concentrati con lo SpinCon lievi alterazioni della morfologia come: uova parzialmente decorticate di *Ascaris lumbricoides*, uova di *D. latum* con opercoli aperti e larve di *Strongyloides stercoralis* con tagli da trauma meccanico. Tuttavia, il nuovo sistema è pratico e veloce e il campione concentrato si presenta omogeneo e privo di detriti grossolani. SpinCon rappresenta una valida alternativa ai tradizionali sistemi di concentrazione che utilizzando prodotti chimici potenzialmente tossici, oltre a rappresentare un pericolo per gli operatori sanitari, richiedono un impegno economico per un adeguato smaltimento dei rifiuti.

P142

DIENTAMOEBA FRAGILIS E LIQUIDI FISSATIVI: VALUTAZIONE AI FINI DI UNA RAPIDA IDENTIFICAZIONE DEI TROFOZOITI.

De Canale E., Tessari A., Lo Russo L., Campion L.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche
U.O. di Microbiologia e Virologia
Complesso Convenzionato Azienda Ospedaliera -
Università Padova.

Dientamoeba fragilis (DF) è un protozoo intestinale a diffusione cosmopolita. La prevalenza di questa infestazione, negli USA e in altri paesi industrializzati, è comunemente del 2-4% nella popolazione non selezionata. Il tasso di prevalenza, tuttavia, aumenta ed è compreso tra il 19 ed il 69% in gruppi di pazienti selezionati. Scopo del nostro lavoro è di dimostrare l'importanza dell'utilizzo di un liquido fissativo adatto per la raccolta ed il trasporto del campione fecale nei casi sospetti per dientamebosi e di sottolineare l'importanza dell'addestramento al microscopio in parassitologia.

Materiali e metodi:

Dieci pazienti risultati positivi per DF hanno raccolto a domicilio quattro aliquote dal medesimo campione fecale subito dopo l'evacuazione. Le aliquote sono state raccolte in tre flaconi contenenti liquidi fissativi diversi e in uno privo di liquido. I campioni sono giunti al nostro laboratorio entro 3 ore dall'emissione e tutte le aliquote sono state immediatamente esaminate al microscopio ottico da tre parassitologi addestrati al riconoscimento di DF tramite l'esame diretto dei campioni fecali. Dieci microlitri di sospensione fecale sono stati osservati a "fresco" a 400 ingrandimenti con coprioggetto di 22x22 mm. Nel frattempo è stata eseguita la colorazione di Giemsa su tutti i campioni. I liquidi fissativi oggetto del nostro studio sono stati: SAF (sodio acetato-acido acetico-formalina), ECOFIX e FORMALINA 10%.

Risultati:

Complessivamente i trofozoiti di DF sono stati ritrovati solo nei campioni di sei pazienti e soltanto nelle aliquote raccolte in SAF ed Ecofix. Quantitativamente, il materiale conservato in SAF presentava un numero di trofozoiti per campo microscopico superiore di circa un terzo rispetto allo stesso materiale raccolto in ECOFIX. DF è stata rilevata solo in quattro campioni conservati in FORMALINA 10% ma in numero ridotto di oltre la metà rispetto ai protozoi presenti nella frazione raccolta in SAF. Solo tre campioni raccolti in assenza di liquido fissativo contenevano protozoi ma in numero ridotto di almeno un terzo rispetto al SAF.

Da un punto di vista qualitativo solo i trofozoiti conservati in SAF venivano immediatamente identificati da personale addestrato, mentre quelli conservati in ECOFIX si presentavano poco riconoscibili all'osservazione diretta perché "coartati". Al contrario i trofozoiti conservati in 10% FORMALIN apparivano come "diafanizzati" e sono stati riconosciuti a fatica anche da personale esperto. I protozoi ancora presenti nelle aliquote non "fissate" apparivano morfologicamente simili a quelli visibili nelle frazioni raccolte in SAF.

Conclusioni:

Dei liquidi fissativi da noi studiati il SAF, oltre a preservare l'integrità morfologica, appare abbastanza "aggressivo" da fissare i protozoi in atteggiamenti plastici (pseudopodi tipo "golf-club") che ne facilitano l'identificazione rapida. DF potrebbe rappresentare un parassita ideale nello studio delle proprietà "fissative" dei liquidi conservanti.

P143

LEISHMANIOSI VISCERALE: SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DI TECNICHE DIAGNOSTICHE "CLASSICHE" E DI UNA METODICA IN "NESTED" PCRGatti S.¹, Gramegna M.², Klersy C.³, Madama S.², Bruno A.⁴, Maserati R.⁴, Bernuzzi A.M.¹, Cevini C.¹ e Scaglia M.⁴¹Lab.Parassitologia, Serv.Virologia, IRCCS S.Matteo, Pavia;²Clonit Srl, Milano;³Serv.Biom. Epidemiol.Clinica, IRCCS S. Matteo, Pavia;⁴Dip. Malattie Infettive, Università-IRCCS S.Matteo, Pavia**Scopo dello studio**

Stabilire la concordanza diagnostica di varie metodologie diagnostiche, in particolare tecniche classiche come l'identificazione microscopica e l'isolamento culturale di *Leishmania* spp., e di una "nested" PCR in 2 gruppi di soggetti, rispettivamente immunocompetenti (IC) ed immunodepressi (ID) per varie cause. Come "gold standard" è stato considerato l'insieme dei dati epidemiologico-clinici e laboratoristici dei soggetti in esame.

Pazienti e metodi

Sono stati esaminati 67 soggetti (35 IC, 32 ID di cui 18 HIV-positivi, 6 pazienti sottoposti a trapianto d'organi ed 8 affetti da emolinfopatie maligne). Il protocollo diagnostico è stato comprensivo di: a) esame microscopico diretto di strisci o apposizioni di agoaspirato midollare e/o di citocentrifugato di sangue periferico, colorati con Giemsa; b) coltura *in vitro* in terreno NNN-agar; c) screening sierologico mediante test immunocromatografico rapido (RapidTest, RT, Diasys Europe Ltd, Wokingham RG41 2QL, England), immunofluorescenza indiretta (IFAT, *Leishmania* Spot IF[®], bioMérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France) ed immunoblotting (Wb, *Leishmania* WB IgG[®], LDBIO Diagnostics, 69009 Lyon, France); d) "nested" PCR (Clonit Srl, Milano, Italy), con amplificazione di un segmento di 215 bp situato sul gene che codifica per la sub-unità 18S dell'RNA ribosomale. L'analisi statistica è stata effettuata con programma Stata 7.

Risultati e Considerazioni conclusive

Per 41 pazienti (61.2%) è stata confermata la diagnosi di infezione viscerale da *Leishmania* spp.; 19 soggetti erano IC, 12 HIV-positivi, 4 pazienti trapiantati e 6 erano affetti da neoplasie. L'analisi statistica ha evidenziato che nel gruppo dei soggetti IC la concordanza tra le differenti tecniche diagnostiche dirette, sierologiche e test in PCR è risultata pressoché sovrapponibile in riferimento alle percentuali di sensibilità (da 83.3 al 100%), tranne che per citocentrifugato e coltura da "buffy-coat", che hanno invece registrato tassi percentuali di concordanza inferiori (78.9 e 83.3 % rispettivamente). Al contrario, nel gruppo di soggetti ID, soprattutto se HIV-positivi, si è evidenziato che le indagini sierologiche possono essere considerate il primo "step" diagnostico in un protocollo di screening per la leishmaniosi viscerale (IFAT: sensibilità 80.9%, specificità 100%; Wb: sensibilità 95.2%, specificità 100%). Dai risultati ottenuti è stata confermata l'attendibilità della "nested" PCR, specie se eseguita su sangue periferico, nella diagnosi di leishmaniosi viscerale sia in soggetti IC che ID (sensibilità pazienti IC: 93.3%; sensibilità pazienti ID: 100%; specificità in entrambi i gruppi: 100%).

P144

PREVALENZA DI INFEZIONE DA STRONGILOIDIOSI IN PAZIENTI ANZIANI OSPEDALIZZATI: METODI A CONFRONTO

Gigli C., Pirisi M.^o, Risoffi Z.^{*}, Ferrante R., Fortina G., Smirne C., Salvador E.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia,
Ospedale Maggiore Novara
^o Dipartimento di Scienze mediche
Università del Piemonte Orientale A. Avogadro
^{*} Centro per le malattie tropicali
Ospedale Sacro Cuore Negrar (Verona)

Scopo: Rilevare la presenza di infestazione di *Strongyloides stercoralis* in soggetti ospedalizzati asintomatici a rischio per tale nematodosi, individuare un metodo diagnostico efficace per lo screening dei pazienti residenti in zone a rischio.

Materiali e metodi:

Durante il periodo settembre 2002 e marzo 2003 sono stati selezionati 100 pazienti ricoverati a vario titolo presso l'Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" di Novara che presentavano all'emocromo conta eosinofila >500 µl ed età >60 anni. Il plasma di questi pazienti è stato sottoposto ad un test di immunofluorescenza indiretta presso il laboratorio del centro di Malattie Tropicali di Negrar (Verona) per la ricerca di anticorpi anti *Strongyloides*. I pazienti positivi alla sierologia sono stati indagati successivamente con la coltura su agar delle feci.

Risultati: 9 (9%) pazienti sono risultati positivi alla sierologia con un titolo > 1:80, in tutti si riscontrava la presenza di due fattori decisivi: la conta eosinofila elevata e un'anamnesi positiva di lavoro contadino. La coltura delle feci su agar ha permesso di evidenziare la presenza di larve in due (22%) dei 9 pazienti.

Conclusioni: Lo *S. stercoralis* è presente nell'area novarese, l'infestazione pur rimanendo silente nell'individuo per parecchi anni può evidenziarsi in corso di situazioni scatenanti: neoplasie ematologiche, trapianti, trattamento con corticosteroidi, ecc.; pertanto risulta importante diagnosticare e trattare la strongiloidiasi cronica asintomatica. Alle tecniche di elezione rappresentate dalla coltura o Baermann si rende utile affiancare un test di immunofluorescenza indiretta per lo screening dei pazienti residenti in zone a rischio

P145

DUE CASI CLINICI DI STRONGILOIDIASI A CONFRONTO

Gilardi G.¹, De Lauri E.¹, Martuscelli S.², Clementi C.², Tronci M.¹

¹ UOC Microbiologia e Virologia

² Unità di Epatologia Clinica, Azienda Ospedaliera "S. Camillo Forlanini", via Portuense 332, 00149 Roma

A febbraio di questo anno è giunto alla nostra osservazione un primo paziente italiano di sesso maschile di circa 80 anni con modesto quadro clinico: lieve aumento di transaminasi e bilirubinemia, episodi diarroici con modesto e fugace prurito al capo e alle estremità. Venivano subito eseguiti altri accertamenti tra cui emocromo, IgE, screening sierologico per epatiti e autoimmunità, e iniziata una terapia con antistami-

nici.

Il paziente riferiva un lieve miglioramento con la terapia antistaminica, ma non la scomparsa degli episodi diarroici. Dagli esami di laboratorio si evidenziava una modesta ipergammaglobulinemia, positività sierologia per HCV, IgE totali molto elevate (932 kU/ml) con prove allergiche negative, ed eosinofilia 15.8%. Dall'esame di un primo campione fecale si osservava un'unica larva di nematode. Un secondo campione di feci sottoposto alla tecnica di Baermann per la concentrazione di larve di *Strongyloides stercoralis* dava esito positivo. Tale positività veniva confermata con tecnica culturale.

Il secondo caso: paziente di sesso femminile di nazionalità ecuadoriana da 3 anni in Italia con gravidanza portata a termine da circa 3 mesi; allattamento al seno, fino al giorno prima del ricovero ospedaliero effettuato per sospetta epatite acuta.

La paziente presentava dolore addominale ipocondrio destro irradiantesi alla regione costo-lombare destra con nausea e febbre (38 °C) non vomito né diarrea, presente però nei giorni precedenti. La paziente inoltre lamentava prurito diffuso agli arti inferiori.

Gli esami ematochimici erano molto elevati (ALT, AST, gGT, fosfatasi alcalina, bilirubina) e anche qui l'esame emocromocitometrico evidenziava il 25,9% di eosinofilia. I markers dell'epatite risultavano tutti negativi. Il quadro clinico migliorava con l'inizio di terapia antibiotica a largo spettro, ma permaneva eosinofilia (21%). Un primo esame parassitologico evidenziava un'unica larva di nematode. Un successivo campione processato con le due tecniche (Baermann e culturale su piastra) evidenziava diverse larve di *Strongyloides stercoralis*.

Conclusioni Mancano dati sull'incidenza di questa parassitosi in Italia, a parte poche notizie che riguardano l'Umbria, una regione endemica come la pianura padana e il Veneto.

Dopo la terapia con albendazolo, sono tuttora in corso i controlli di laboratorio per una doverosa certezza di negatività dei campioni.

P146

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DELLA "NESTED PCR" VERSO ONE STEP E REAL TIME PCR NELLA DIAGNOSI DELLA TOXOPLASMOSI

Meroni V.¹, Zerrilli E.¹, Genco F.¹, Bernuzzi A.², Cevini C.², Gramegna M.³, Madama S.³

¹ Dipartimento di Malattie Infettive Università degli Studi, IRCCS Policlinico San Matteo Viale Taramelli 5 27100 Pavia

² Laboratorio di Parassitologia, Servizio di Virologia IRCCS San Matteo Viale Taramelli 5 27100 Pavia

³ Clonit Srl, Via Quaranta, 57 20139 Milano

Scopo di questo studio è valutare la sensibilità e specificità di un sistema di amplificazione in nested che individua come bersaglio di amplificazione una regione del gene B1 di *Toxoplasma*. I risultati sono stati successivamente comparati con quelli ottenuti con one step PCR e Real time PCR. Sono stati testati complessivamente 42 campioni biologici così suddivisi: 17 liquidi amniotici (LA) di cui 12 processati con one step e nested PCR e 5 solo in nested; 5 campioni di sangue periferico (SP) di cui 2 testati solo in nested; 15 campioni di sangue cordonale di cui 6 testati solo in nested; 5 liquor di cui 1 in nested. Con il metodo RT PCR sono stati analizzati tutti i liquidi amniotici. Nel protocollo diagnostico sono stati utilizzati sia per one step sia per nested PCR i kit dia-

agnostici prodotti da Clonit srl, Milano. La real time PCR di riferimento è stata effettuata presso "Institut De Puericulture et De Perinatalogies", Parigi. Con i tre sistemi è risultato positivo un liquido amniotico, mentre con nested e one step PCR si è rilevata la positività di 2 campioni di sangue periferico e 3 campioni di sangue cordonale. Nessun campione di liquor è risultato positivo. La positività del liquido amniotico è stata confermata dall'infezione clinicamente e sierologicamente accertata nel neonato. I 2 prelievi positivi di sangue periferico appartenevano a pazienti con sieroconversione recente e per i 3 campioni di sangue cordonale è ancora in corso il follow-up dei neonati. Possiamo concludere che i dati in nested sono sovrapponibili a quelli preliminarmente ottenuti in singola amplificazione, ma presentano il vantaggio di una maggiore intensità del segnale che ne rende più facile l'interpretazione. L'applicazione del sistema RT PCR sui liquidi amniotici conferma i risultati delle altre metodiche.

P147

STUDIO DELLA PRESENZA IN *IXODES RICINUS* DI *BABESIA* E *RICKETTSIA*

Piccolin G., Lorenzato C., Modolo E., Papa N., Schiavon R., Zasio C., Bertiato G.

Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e di Microbiologia, Ospedale "S. Martino", Belluno Centro Regionale di riferimento per la diagnostica delle Malattie Trasmesse da Zecche

A seguito di una campagna di raccolta di zecche in 244 siti della provincia di Belluno abbiamo ricercato la presenza di *Babesia* e *Rickettsia* in esemplari di *Ixodes ricinus*. Si tratta di microrganismi agenti di zoonosi ma che possono causare patologie nell'uomo.

Materiali e metodi.

La raccolta delle zecche, col metodo della "coperta strisciata", si è svolta in 40 siti "stagionali" ogni mese, da marzo a settembre, mentre su 204 siti "territoriali", distribuiti in modo da coprire tutta la provincia, è stato eseguito un solo campionamento. Negli adulti il DNA è stato estratto con metodo fenolo/cloroformio, in ninfe e larve con idrossido di ammonio. Ciascun estratto è stato amplificato con i primer 16a/16b specifici per sequenze di DNA mitocondriale di *Ixodes ricinus*, come controllo dell'estrazione e per verificare l'appartenenza alla specie. Per la ricerca di *Babesia* sono stati utilizzati i primers PIRO-A/PIRO-B, e per la ricerca di *Rickettsia* è stata eseguita una Nested-PCR con i primers Ric, Ric-U8 e Ric-Rt: queste coppie di primers amplificano una specifica regione del gene 16S del DNA ribosomiale del microrganismo.

Risultati.

Nei siti "stagionali" sono state raccolte ed analizzate 1931 zecche; in questi siti la positività per *Babesia* e *Rickettsia* è risultata del 1.6%. Nei siti "territoriali" sono state raccolte 4056 zecche; dei 149 siti indagati, in pool, sono risultati positivi per *Rickettsia* il 6% e per *Babesia* il 2%.

Conclusioni.

Nelle aree in cui sono endemiche le infezioni trasmesse da zecche si deve studiare non solo la presenza di *Borrelia*, *TBEV* ed *Ehrlichia*, che possono sviluppare significative malattie nell'uomo, ma anche microrganismi con minore ruolo di patogenicità.

P148

MALARIA DI IMPORTAZIONE: DATI EPIDEMIOLOGICI DEI CASI DIAGNOSTICATI DAL 2000 AL 2003 PRESSO L'OSPEDALE AMEDEO DI SAVOIA (TO)

Sergi G., De Paola M., Castelli L., Fianchino B., Bossi V., Del Re S., Faraoni S., Gregori G., Gallina V., Milano R.

Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio, U.O.A. di Virologia e Microbiologia, Osp. Amedeo di Savoia, Torino

Scopo dello studio La malaria, endemica nelle aree tropicali del mondo, è la più comune malattia di importazione in Italia. Per contribuire a definirne il profilo epidemiologico, sono stati analizzati i dati relativi ai casi diagnosticati nel Laboratorio di Microbiologia.

Materiali e Metodi La ricerca del plasmodio è stata eseguita su sangue periferico mediante esame microscopico (striscio sottile e goccia spessa) ed un test immunocromatografico (NOW[®] ICT Malaria P.f./P.v., BINAX).

Risultati

2000-2003: 1007 ricerche di plasmodio; 233 (23,1%) casi positivi (59,2% stranieri e 40,8% italiani) di cui 19 (8,1%) hanno attuato la chemioprolifassi (13 italiani e 6 stranieri).

2000: 274 ricerche di plasmodio, 210 negativi e 64 (23,3%) positivi; 56 infezioni da *P. falciparum* (87,5%), 7 da *P. vivax* (10,9%) 1 mista da *P. falciparum* e *P. malariae* (1,6%).

2001: 256 ricerche di plasmodio, 194 negativi e 62 positivi (24,2%); 51 infezioni da *P. falciparum* (82,2%), 10 da *P. vivax* (16,1%) 1 da *P. malariae* (1,6%).

2002: 236 ricerche di plasmodio, 184 negativi e 52 positivi (22,0%); 46 infezioni da *P. falciparum* (88,5%), 5 da *P. vivax* (9,6%) 1 da *P. ovale* (1,9%).

2003: 241 ricerche di plasmodio, 186 negativi e 55 (22,8%) positivi; 48 (87,3%) infezioni da *P. falciparum*, 4 (7,3%) da *P. vivax*, 2 da *P. ovale* (3,6%), 1 infezione mista da *P. falciparum* e *P. malariae* (1,8%).

Considerazioni L'andamento dei casi di malaria dal 2000 al 2003 non evidenzia una significativa variazione. La percentuale delle infezioni malariche è maggiore fra gli stranieri probabilmente perché, oltre ad aver perso lo stato di premunizione, raramente adottano misure di profilassi farmacologica e/o comportamentale al rientro nel paese di origine. Si evidenzia l'opportunità di informare i viaggiatori sulla necessità di una corretta profilassi per ridurre il rischio di infezione.

P149

PARASSITOSI DA *A. LUMBRICOIDES*, *S. STERCORALIS*, *T. TRICHIURA* ED *ENTAMOEBAS COLI*

Sala E., Sticca M.*, Spinelli M., Giana G.

Laboratorio di Patologia Clinica,

*U.O. Pediatria, Ospedale Sant'Anna - COMO.

Introduzione

Paziente boliviano, maschio di 9 anni, in Italia da 3 mesi. Da tempo lamenta irregolarità dell'alvo con diarrea alternata a stipsi ed algie addominali, a carattere colico. Giunge alla osservazione del P.S. di Pediatria per rialzo febbrile (39°C) con algie addominali di tipo colico prevalentemente ai quadranti di sinistra: il quadro clinico porta al ricovero presso la U.O. di Pediatria.

Metodi

Il paziente viene quindi indagato, nel sospetto clinico di sub-occlusione intestinale, con Rx addome, ecografia addome, valutazione chirurgica ed esami ematochimici di routine.

Risultati

Rx addome: esclude la presenza di aria libera e di evidenti livelli idroarei; assenza di immagini radiopache da formazioni litiasiche a carico dell'apparato urinario; importante distensione gassosa delle anse mesenteriali e coprostasi; non segni di occlusione. Eco addome: nella norma fegato, vie biliari e colecisti; non versamenti liberi peritoneali; tra rene e milza presenza di anse mesenteriali distese da materiale corpuscolato e peristalsi torpida. Visita chirurgica: esclude un quadro occlusivo e consiglia osservazione. Esame emocromocitometrico: la formula leucocitaria evidenzia il 24 % di granulociti eosinofili. Esegue esame coproparassitologico (PARAPAK SAF FORMALIN, Meridian) che evidenzia numerose uova di *A. lumbricoides*, numerose larve di *S. stercoralis*, rare uova di *T. trichiura* e rare cisti di *E. coli*; allo scotch-test: rare uova di *T. trichiura*. Il paziente, tenuto sotto stretta osservazione clinica e in terapia infusione con soluzione glucosalina, viene successivamente trattato con mebendazolo (100 mgx2 al dì per 3 giorni). Segue eliminazione di verme di *A. lumbricoides* della lunghezza di 27 cm. Progressiva risoluzione della sintomatologia clinica.

Conclusioni

Il quadro clinico iniziale, riferibile a sospetta subocclusione intestinale, ed il reperto ecografico di dubbia interpretazione sono stati quindi chiariti alla luce del riscontro di importante parassitosi intestinale. Si sottolinea l'importanza di un accurato raccordo anamnestico (recente immigrazione) ai fini diagnostici di patologie infettive di raro riscontro nella pratica clinica quotidiana.

P150

DESCRIZIONE DEL PRIMO CASO DI LOIASI (FILARIOSI) A PARMA.

Calderaro A., Piccolo G., Zuelli C., Incaprera, M., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Dettori G., Chezzi C.

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

L'aumento degli italiani che viaggiano in paesi in via di sviluppo e degli immigrati che periodicamente rientrano nel loro paese d'origine, è alla base dell'aumento delle malattie d'importazione in Italia. In questi giorni, presso il nostro laboratorio è stato diagnosticato un caso di loiasi, causata da microfilarie trasmesse da un dittero ematofago del genere *Crysops*, presente in Africa centrale ed occidentale e raramente riportata in Italia. Una donna camerunense di 30 anni ha accusato, circa due settimane dopo il suo arrivo in Italia, dolore acuto al bulbo oculare sinistro con sensazione di corpo estraneo.

La paziente era in condizioni di benessere generale, non aveva eosinofilia né indici di flogosi. La consulenza infettivologica richiesta da un centro di accoglienza per immigrati, ha formulato il sospetto di un'infestazione da *Toxocara canis*.

Il siero della paziente, inviato al nostro laboratorio, è risultato negativo per la ricerca di anticorpi anti-*Toxocara* spp. e anti-*Trichinella* spp.

L'anamnesi della paziente aveva fatto sospettare al parassitologo una filariosi e il campione di sangue richiesto allo scopo, sottoposto ad osservazione microscopica a fresco ha

rivelato la presenza di microfilarie mobili e, dopo concentrazione secondo Knott e colorazione con Giemsa, ha consentito di verificare la presenza di microfilarie appartenenti alla specie *Loa loa*.

L'identificazione è stata possibile in seguito alle seguenti caratteristiche morfo-strutturali: lunghezza 300 mm, diametro 7 mm, spazio cefalico 5 mm, presenza di nucleo distale in posizione terminale.

Nel siero, nel plasma e nel sangue è stata riscontrata l'assenza di antigeni specifici di *Wuchereria bancrofti*, microfilaria a maggiore diffusione di *Loa loa*.

La descrizione di questo caso vuole soprattutto richiamare l'attenzione sul ruolo fondamentale che ha assunto il laboratorio di Parassitologia Clinica in questi anni. Infatti, come nel nostro caso, la stretta collaborazione fra infettivologo e parassitologo, preparato a sospettare malattie non endemiche nel nostro paese, ma non per questo assenti, può consentire una tempestiva e corretta diagnosi.

P151

VALUTAZIONE DI HCV CORE ANTIGENE E HCV RNA PCR IN UNA POPOLAZIONE DI PAZIENTI POLITRASFUSI IN ETÀ PEDIATRICA.

Tagliaro L., Balbo L., Albano F., Alfaro A., Dutto D., Lievre M.A., Rostagno M.F.

A.S.O. O.I.R.M. S. ANNA, c.so Spezia, 60 Torino
Dipartimenti di Patologia Clinica e Scienze pediatriche e dell'adolescenza

Obiettivo Scopo di questo studio è stato il confronto tra i dati analitici di 2 metodiche: la ricerca dell'antigene core HCV e l'HCV RNA PCR al fine di evidenziare il grado di concordanza e gli eventuali limiti.

Materiali e metodi Sono stati esaminati 105 campioni raccolti nel periodo gennaio-dicembre 2003, provenienti da 85 pazienti dei reparti di Microcitemia, Gastroenterologia e Infettivologia, portatori cronici di HCV.

I sieri selezionati risultavano tutti reattivi per anticorpi antiHCV (chemiluminescenza - Vitros ECI) con ratio compresa tra 1.01 e 44.9. Su tutti è stata eseguita la ricerca dell'antigene core (E.L.I.S.A., Track-C Ortho Clinical Diagnostics) ed il dosaggio in PCR con tecnica Real-time Taqman e Cobas Amplicor (HCV Monitor V 2.0 Roche)

Risultati 70 sieri sono risultati positivi per entrambi i dosaggi mentre 31 sono stati concordemente negativi.

I 4 sieri discordanti sono risultati negativi per la ricerca dell'antigene e positivi per HCV-RNA-PCR; in particolare sono risultati tutti positivi al test PCR Realtime e alla determinazione quantitativa eseguita con Cobas Amplicor hanno presentato valori tra 2.47×10^2 U.I./ml. e 5.02×10^3 U.I./ml.

Conclusioni Da questi dati possiamo osservare che le due metodiche hanno dimostrato una buona concordanza.

In particolare la specificità di HCV core Antigene è risultata del 100%.

È da segnalare che i casi discordanti hanno presentato una carica virale inferiore alle 8×10^3 U.I./ml., considerato dalla letteratura come limite di sensibilità della metodica.

Il test è risultato di facile impiego ed utilizzabile, anche routinariamente, in laboratori non particolarmente attrezzati per l'approfondimento diagnostico dell'infezione da virus HCV con notevole risparmio di risorse umane ed economiche.

P152

SVILUPPO DI UN SAGGIO DI REAL-TIME PCR PER LA QUANTIFICAZIONE DEL DNA DI HPV IN CAMPIONI CITOLOGICI CERVICALI

Ambretti S., Venturoli S., Cricca M., Filippone C., Delbarba S., Manaresi E., Musiani M., Zerbini M.

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

L'infezione da Papillomavirus Umani (HPV) ad alto rischio oncogeno costituisce un importante fattore di rischio per l'insorgenza di lesioni displastiche a livello della cervice uterina e per la progressione in senso neoplastico di tali lesioni. Negli ultimi anni è emersa la necessità di valutare l'associazione fra carica virale e storia naturale delle lesioni cervicali HPV-correlate. A questo scopo abbiamo messo a punto un saggio di Real Time PCR, in formato Sybr Green, in grado di quantificare il DNA di HPV presente in campioni citologici cervicali e di fornire un risultato normalizzato per numero di cellule grazie alla quantificazione del gene housekeeping gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH).

Per l'identificazione di un ampio numero di HPV rilevabili in lesioni premaligne, abbiamo studiato un pool di primer di consenso che consente l'amplificazione di un frammento della regione L1 del DNA di 8 importanti genotipi mucosi ad alto rischio oncogeno (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58) e dei 2 principali genotipi a basso rischio (6, 11). Il saggio consente non solo la quantificazione del DNA di HPV ma anche la genotipizzazione mediante analisi delle curve di melting.

Il GAPDH viene amplificato in una reazione separata da una coppia di primer specifici. La quantificazione di un gene housekeeping permette di effettuare una valutazione del DNA di HPV che tenga conto della variabilità per numero di cellule dei campioni in esame.

Per la validazione della tecnica sono stati utilizzati per per l'HPV plasmidi contenenti la regione L1 del DNA dei 10 genotipi studiati, per il GAPDH DNA genomico umano.

Il saggio è stato quindi utilizzato per analizzare 30 campioni citologici cervicali provenienti da donne con lesioni di diverso grado (ASCUS, LSIL, HSIL). I risultati indicano come la Real-Time PCR da noi sviluppata sia una tecnica altamente sensibile e riproducibile e possa quindi essere utile nello studio della correlazione fra carica virale e rischio di progressione neoplastica.

P153

DIAGNOSI DI INFEZIONE DA VIRUS DELL'APPARATO RESPIRATORIO: TRE METODI A CONFRONTO.

Arcangeletti M.C., De Conto F., Pinardi F., Medici M.C., Valcavi P., Casula F., Ferraglia F., Motta F., Covan S., 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

Obiettivo principale di questo studio è quello di individuare, nell'ambito delle indagini di laboratorio considerate, quella maggiormente efficace per il rilevamento di virus dell'apparato

respiratorio.

Materiali e Metodi

Le indagini virologiche condotte presso l'Unità di Virologia (Sezione di Microbiologia) di Parma, si riferiscono a 3260 campioni clinici costituiti da secrezioni respiratorie, prelevate a mezzo di tampone o mediante aspirazione ed analizzate in un arco di tempo di 5 anni (1999-2003).

L'immunofluorescenza è stata impiegata sia direttamente sulle cellule esfoliate presenti nel campione, che previo inoculo dello stesso in colture cellulari allestite su vetrino ed incubate per 18-24 ore (esame colturale rapido). In parallelo, i campioni sono stati inoculati in colture cellulari per mettere in evidenza la presenza di agente/i citopatogeno/i (esame colturale tradizionale).

Risultati

La valutazione comparativa dei risultati ottenuti mediante la ricerca di proteine virus-specifiche nelle cellule esfoliate del campione o previo esame colturale rapido, come anche di quelli ricavati attraverso l'esame colturale tradizionale, ha messo in evidenza sostanziali differenze nell'efficacia di rilevamento virale, dipendentemente dalla specie virale in causa. In particolare, l'immunofluorescenza applicata al campione, i cui risultati sono disponibili nell'ambito della stessa giornata di arrivo del campione stesso, sembra essere il metodo di scelta per il virus respiratorio sinciziale, che a sua volta rappresenta il virus più frequentemente riscontrato nei campioni clinici e quello maggiormente in causa nelle infezioni nosocomiali, mentre risulta pressoché inefficace per adenovirus e per i virus influenzali e parainfluenzali. Per il primo, l'esame colturale tradizionale è quello che garantisce i migliori risultati, mentre per le due ultime categorie di virus, l'esame colturale rapido appare come il metodo di scelta.

Considerazioni conclusive

Una scelta mirata delle indagini virologiche, oltre a garantire un valido supporto per il clinico, può permettere, al contempo, l'attuazione di eventuali misure di profilassi, atte ad evitare l'insorgenza e/o la diffusione di infezioni nosocomiali.

P154

METODI TRADIZIONALI E MOLECOLARI A CONFRONTO NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE VIRALE

Arcangeletti M.C., De Conto F., Pinardi F., Medici M.C., Valcavi P., Casula F., Ferraglia F., Motta F., Covan S., 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

E' stata valutata l'efficacia della microscopia elettronica, dell'esame colturale convenzionale e di metodi molecolari avanzati nella diagnosi delle infezioni virali.

Materiali e Metodi

Le indagini virologiche condotte presso l'Unità di Virologia (Sezione di Microbiologia) di Parma, si riferiscono a 5032 campioni clinici, di cui 2288 feci, 115 urine (per la ricerca di virus BK), 2377 tamponi faringei, 252 liquor, analizzati in un arco di tempo di circa 3 anni, dal gennaio 2001 al febbraio 2004. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad esame colturale tradizionale. La microscopia elettronica (ME) è stata impiegata quale metodo rapido direttamente sugli estratti fecali e sui campioni di urina, come anche per l'identifica-

zione degli agenti citopatogeni rivelati mediante esame colturale. Nell'ambito dei 5032 campioni clinici analizzati, 134 campioni di feci, 103 urine e 153 liquor sono stati sottoposti anche a ricerca di acido nucleico virale mediante reazione polimerasica a catena (PCR).

Risultati

L'esame elettromicroscopico utilizzato come mezzo per la diagnosi rapida, è stato in grado di rivelare, entro poche ore dall'arrivo del campione, la presenza di numerosi virus, agenti di enterite, negli estratti fecali, mettendo in evidenza anche doppie infezioni, come la presenza di poliomavirus nei sedimenti urinari. Nell'ambito della diagnosi convenzionale, l'esame colturale ha evidenziato diversi agenti citopatogeni, molti dei quali identificati attraverso ME; tra gli altri, un bunyavirus da liquor. L'utilizzo concomitante di PCR e di ME per la diagnosi rapida ha dimostrato che la prima è stata in grado di rivelare la presenza di virus, attraverso il rilevamento di acidi nucleici virali, in un numero di campioni significativamente maggiore rispetto alla microscopia elettronica.

Considerazioni conclusive

Il confronto tra metodi tradizionali - in particolare microscopia elettronica ed esame colturale - e metodi molecolari quali PCR, rende conto di quanto la scelta fra gli uni e gli altri sia a volte opinabile e di come, in realtà, ognuno di essi fornisca informazioni non sovrapponibili ma complementari al raggiungimento di una esauriente diagnosi di laboratorio.

P155

STUDIO EPIDEMIOLOGICO SULL'INFEZIONE CONGENITA DA CMV E LA SORDITÀ NEUROSENSORIALE IN ITALIA

Barbi M., Binda S., Caroppo M.S., Tanzi M.L., Veronesi L., Germinario C., Calvario A., Bozzi A., Mura I., Piana A., Solinas G.

*Istituto di Virologia, Università degli Studi di Milano,
Via Pascal 38, 20133 Milano*

L'accertamento dell'impatto dell'infezione congenita da Cytomegalovirus (CMV) come causa di disabilità è indispensabile per valutare l'opportunità di adottare strategie preventive. Per raccogliere dati sulla prevalenza dell'infezione congenita in Italia è stato esaminato un campione di 9002 bambini nati in 4 regioni; per ogni neonato è stata effettuata la ricerca del DNA virale sulla Guthrie card allestita alla nascita (DBS test). Il test in questione è di semplice esecuzione, poco costoso e quindi facilmente applicabile su larga scala. Il peso dell'infezione come causa di handicap è stato indagato attraverso l'accertamento del suo ruolo nell'eziologia della sordità neurosensoriale (SNHL). A questo scopo è stato eseguito un follow up audiologico dei neonati con infezione congenita individuati nell'indagine sopra descritta; inoltre è stata effettuata la diagnosi retrospettiva di infezione congenita, tramite analisi delle Guthrie card, in un campione di bambini con SNHL accertata (3 mesi-5 anni). Tra i neonati arruolati sono stati individuati 16 bambini infetti: la prevalenza dell'infezione congenita da CMV è risultata quindi pari all'1,8%. Sia i bambini sintomatici (2) che quelli asintomatici (14) non hanno mostrato segni di danno audiologico né alla nascita né al follow up (16/16 a 6 mesi; 10/16 a 12 mesi e 2/16 a 18 mesi). Le Guthrie card dei 77 bambini con sordità neurosensoriale accertata (> 40 dBHL) sono state recuperate dal Centro Regionale di Screening e saggiate mediante il DBS test: in 19 casi (25%) è stata diagnosticata un'infezione congenita; i bambini in questione erano affetti da sordità

grave o profonda. Si possono quindi trarre le seguenti conclusioni: 1) la prevalenza dell'infezione congenita da CMV in Italia è più bassa di quella stimata in studi precedenti (3-5%); 2) l'infezione congenita sembra essere un'importante causa di SNHL; 3) il DBS test ha giocato un ruolo chiave sia per lo screening che per l'accertamento retrospettivo d'infezione congenita.

P156

CORRELAZIONE TRA CARICA VIRALE ED ESPRESSIONE DEI GENI LITICI DI EBV NEL SANGUE PERIFERICO DI TRAPIANTATI RENALI

Bergallo M., Merlino C., Daniele R., Tarallo S., Margio S., Lapenna A., Negro Ponzi A., Cavallo R.

*Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia,
S.C. Virologia, Università di Torino*

Nei pazienti trapiantati renali è descritto un aumentato rischio di disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) che consistono in un'ampia gamma di manifestazioni patologiche, dall'iperplasia linfoide ai linfomi. E' ormai riconosciuta una forte correlazione tra l'infezione da EBV, il grado ed il tipo di immunosoppressione e l'insorgenza di PTLD. Recentemente, è stata descritta una correlazione tra l'incidenza di PTLD e la quantità di EBV-DNA, misurata mediante PCR quantitativa, nel sangue periferico di questi pazienti. La valutazione della viremia da EBV sembra, quindi, essere un utile indicatore prognostico del rischio di sviluppare una PTLD.

Dal momento che i nostri studi hanno dimostrato, in accordo con quanto riportato in letteratura, che la carica di EBV-DNA nei linfomonociti presenta un andamento fluttuante e che è assente nel siero di trapiantati renali asintomatici, in questo studio abbiamo valutato in parallelo la carica virale e l'espressione dei geni virali litici nel sangue periferico di questi pazienti, allo scopo di evidenziare l'attivazione dell'infezione litica, ulteriore parametro per la valutazione dei pazienti a rischio di PTLD. La carica di EBV-DNA è stata quantificata nei linfomonociti di 46 trapiantati renali (29 maschi, 17 femmine, età media 51,6 +/- 11,5 anni; mediana del tempo dal trapianto 60 mesi; 21 in terapia con FK506 e 25 in ciclosporina A) mediante PCR quantitativa-competitiva messa a punto nel nostro laboratorio, mentre gli RNA messaggeri (mRNA) relativi ai geni litici (BZLF-1; BALF-2; BcLF-1) sono stati determinati mediante nested RT-PCR da noi sviluppata.

P157

SVILUPPO DI UNA PCR QUANTITATIVA COMPETITIVA PER LA VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE DELL'EBV

Bergallo M., Merlino C., Daniele R., Sidoti F., Mantovani S., Negro Ponzi A., Cavallo R.

*Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C. Virologia,
Università di Torino*

I disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) rappresentano una grave complicanza che può verificarsi nei portatori di trapianto d'organo. E' stata descritta una correlazione tra l'infezione da EBV, il grado ed il tipo di immunosoppressione e l'insorgenza di PTLD. Poiché l'EBV è caratterizzato

dal fenomeno della latenza, la PCR qualitativa risulta di scarsa utilità. L'utilizzo di una PCR quantitativa, invece, permette di valutare l'andamento dell'infezione in riferimento ai livelli basali dei singoli pazienti. Questo lavoro descrive lo sviluppo di un protocollo per la quantificazione dell'EBV-DNA al fine di monitorare l'infezione da EBV. Il protocollo prevede uno screening mediante PCR semi-quantitativa dei campioni contenenti un numero $\geq 10^3$ genomi virali/ 10^5 linfomonociti o 100 μ l di siero, seguito da una quantificazione più precisa della carica virale dei campioni che superano tale soglia, mediante PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR). La costruzione del competitore si è basata sulle differenti dimensioni degli ampliconi del wild-type e del competitore (171 bp vs. 247 bp). I risultati ottenuti mostrano che sia il competitore sia il bersaglio vengono amplificati con la stessa efficienza, se coamplificati con la medesima miscela di reazione. Nella PCR semi-quantitativa vengono utilizzate, come standard esterno, quattro diluizioni scalari di pEB171, (50, 1000 copie), ciascuna contenente 50 copie del plasmide pEB-C per calibrare lo standard esterno e per controllare la presenza di eventuali inibitori della Taq polimerasi nei campioni. La QC-PCR si basa sulla coamplificazione del campione con quattro diluizioni del competitore pEB-C (standard interno) contenenti 1.000, 5.000, 10.000, e 50.000 copie, rispettivamente. In conclusione, il protocollo sopra descritto può rivelarsi un valido strumento per valutare l'andamento dell'infezione da EBV nei soggetti portatori di trapianto d'organo allo scopo di individuare le riattivazioni virali e studiarne il ruolo nell'insorgenza dei disordini linfoproliferativi post-trapianto.

P158

SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI OSPEDALIERE DA ROTAVIRUS IN UN OSPEDALE PEDIATRICO

*Portanova A., **Bernaschi P., **Argentieri M., **Menichella D., *Langiano T.

**U.O. Laboratorio di Microbiologia
Osp. Pediatrico Bambino Gesù di Roma
*C.I.O. Direzione Sanitaria
Osp. Pediatrico Bambino Gesù di Roma
Piazza S. Onofrio 4 Roma 00165

Scopo. Data l'elevata incidenza delle infezioni virali nosocomiali del tratto gastro-intestinale in età pediatrica, esse rappresentano infatti il 35% di tutte le Infezioni Ospedaliere, abbiamo valutato la frequenza di Infezioni Ospedaliere da Rotavirus in un ospedale pediatrico nell'anno 2003 in tutte le Unità Operative. Viene riportato dalla letteratura che in Pediatria Generale tale frequenza è compresa tra 68,7-76%.

Materiali e metodi. Nell'anno considerato sono giunti al nostro laboratorio 644 campioni di feci da Reparti di Degenza. La metodica si basa sulla ricerca diretta dell'antigene. L'età media dei pazienti reclutati nello studio è di 20 mesi. Sono state definite I.O. i campioni positivi ottenuti da pazienti ricoverati da almeno 72 ore.

Risultati. Sono risultati positivi, alla ricerca del Rotavirus, 184 campioni (28,6%) di questi 57 (31%) rappresentano Infezioni Nosocomiali mentre le Infezioni comunitarie sono 127 (69%).

Dalla sorveglianza si evidenzia, come già noto, che il maggior numero di infezioni si è verificato durante i mesi invernali.

Conclusioni. Le I.O. da Rotavirus non differiscono per gravità o per sintomi dalle infezioni acquisite in comunità ma

possono aggravare il quadro clinico di bambini affetti da altre patologie, prolungando ulteriormente il ricovero.

Importante per prevenire la diffusione di queste infezioni all'interno delle strutture ospedaliere sono soprattutto l'impiego di accurate misure igieniche. Pertanto dallo studio si evince la necessità di emanare delle raccomandazioni per la prevenzione delle infezioni ospedaliere da Rotavirus, con una formazione mirata nei diversi Reparti di degenza. Dopo la formazione/informazione verrà ripetuto lo studio per verificare se se sono state adottate le raccomandazioni suggerite con conseguente diminuzione delle infezioni nosocomiali.

P159

UTILITÀ DIAGNOSTICA DELLA RICERCA DI CEPPI ONCOGENI DI PAPILLOMA VIRUS NELLA PREVENZIONE DEL CANCRO DELLA CERVICE

Venturi C., Marini P., Apicella P., Bianchi L.

Ospedale di Pescia, "SS Cosma e Damiano", ASL 3 Pistoia, Zona della Val di Nievole, Via Cesare Battisti 2, 51017 Pescia (PT).

Numerose evidenze biologiche ed epidemiologiche indicano come l'infezione persistente della cervice uterina da parte di ceppi HPV ad alto rischio oncogeno (16, 18, 31, 33) si associ alla presenza e sviluppo di lesioni intraepiteliali squamose pre-invasive ed invasive.

Obiettivi. Con questo studio abbiamo valutato:

- 1) l'incidenza dell'infezione da HPV in pazienti che presentavano lesioni intraepiteliali al pap-test;
- 2) la correlazione esistente fra ceppi ad alto rischio oncogeno e gravità delle lesioni.

Metodologia. In una popolazione di 583 donne di età compresa tra i 15 e gli 81 anni (febbraio 2001-ottobre 2003) che presentavano al pap-test lesioni cervicali intraepiteliali quali ASCUS (anomalie squamose di incerto significato), LSIL (lesioni intraepiteliali squamose di basso grado) e HSIL (lesioni intraepiteliali squamose di alto grado) è stato ricercato l'agente virale HPV da prelievo endocervicale. Le metodiche impiegate sono: 1) per la ricerca, la reazione a catena della polimerasi (PCR) con l'utilizzo di primers specifici della regione L1; 2) per la genotipizzazione, la digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione Tru91 e Rsa1 (Diatech).

Risultati. L'infezione da HPV è stata riscontrata nel 22% (35/160) di ASCUS, nell'82% di LSIL (116/141) e nel 94% di HSIL (16/17). Gli HPV ad alto rischio rappresentano il 68,6% (24/35) di ASCUS HPV-positivi, il 65,5% (76/116) di LSIL HPV-positivi ed il 94% (15/16) di HSIL HPV-positivi. Al controllo istologico dei 17 HSIL, 1 presentava un carcinoma in situ, 7 una displasia grave, 5 una displasia moderata, 3 una displasia lieve e 1 una leucoparacheratosi.

Tra i ceppi virali a basso rischio il più frequente è risultato l'HPV11 (18,8%) e fra quelli ad alto rischio i più frequenti sono risultati l'HPV16 (23,7%) e l'HPV 31(16,2%).

Conclusioni. 1) La rilevanza diagnostica della ricerca e genotipizzazione dell'HPV per selezionare le pazienti a più alto rischio per il carcinoma della cervice uterina permette un più attento monitoraggio e un trattamento più adeguato e efficace; 2) l'incidenza di HPV ad alto rischio oncogeno del 94% nei casi HSIL, in accordo con la recente letteratura internazionale, suggerisce l'utilità della ricerca dell'HPV anche per aumentare l'efficacia dello screening primario.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002 Jan 3:11-6.

P160

STUDIO RETROSPETTIVO SU 30 PAZIENTI HCV+ CON E. C. NON RESPONDER ALL'INTERFERONE. IMPORTANZA DEL GENOTIPO VIRALE.

Bongera M.*, Ceresa E.*, Ferrini A.*, Rizzi R.°, Peyre S.°

* U.O.A. Dip. Patologia Clinica ASL 9 P.O. Cuorgnè

° U.O.A. Gastroenterologia ASL 9 P.O. Cuorgnè

Obiettivo : verificare l'utilità del genotipo virale nella scelta e nella modulazione della terapia.

Metodi : popolazione di 30 pazienti, età media 44.9, range 21-72 anni di cui 6 con cirrosi (20%) trattati inizialmente con interferone.

Determinazione su tutti i pazienti della carica virale con AMPLICOR HCV Monitor e del genotipo con saggio di ibridazione inversa su striscia.

(Genotype HCV III Nuclear Laser Medicine).

Mod. trasmissione/Gen	1a-b	2a/c	3a	4
Parenterale 43,3%	3		8	2
Emotrasfusionale 16,7%	4	1		
Sconosciuta 40,0%	9			3

Risposta: 33.3% relapse
66.6% non responder

Risultati

Dopo trattamento con Ribavirina:

	N°pazienti	1a-b	2a/c	3a	4
Responder	4	2		2	
Non resp	12	7			5
Relapse	10	5	1	4	
Drop out	4	2		2	

Considerazioni conclusive: la determinazione del genotipo è fondamentale per valutare la probabilità di successo dell'eventuale trattamento terapeutico.

P161

DESCRIZIONE DEL DECORSO DI INFEZIONE DA HCV DOPO INCIDENTE OSPEDALIERO

Bonini F.*, Manetti M.*, Bolognesi L.**

*Servizio di Patologia Clinica -

Sez. Microbiologia Biologia molecolare P.O. Livorno;

**Rep. Malattie Infettive. P.O. Livorno.

Scopo del presente lavoro è la descrizione di un caso d'infezione acuta da HCV dopo incidente ospedaliero.

Una colluttazione avvenuta fra un operatore sanitario ed un degente ha provocato escoriazioni in entrambi i soggetti con contatto reciproco. Il paziente, in seguito ha firmato la dimissione volontaria e si è allontanato dal Presidio Ospedaliero: non è stato quindi possibile effettuare accertamenti sierologici.

L'operatore sanitario è stato monitorato, secondo i protocolli, e, dopo 3 mesi, anticorpi anti-HCV presenti, RIBA III positivo per core C22, NS3 C33, NS4 C100, PCR quantitativa 941 UI-mL, genotipo 3°.

Seguiva un decorso clinico, nei successivi 6 mesi, apparentemente favorevole con negativizzazione della PCR quanti-

tativa: si decideva di non eseguire alcuna terapia. Il valore dell'ALT presentava andamento sinusoidale.

Il controllo dopo 30 giorni rivelava un movimento antigenico (176 U.I.-mL) che aveva un'impennata al controllo del mese successivo (28.000 U.I.-mL): si decideva d'intervenire con RIBAVIRINA 1000-mg/die.

I controlli successivi dimostrano ALT normali e PCR quantitativa negativa.

La metodica PCR monitor Ampliprep-Amplicor correlata col quadro emato-chimico può essere impiegata per prevenire la cronicizzazione di un'infezione da HCV, anticipando l'intervento terapeutico.

P162

STUDIO DELL'ESPRESSIONE DI PARVOVIRUS B19 IN SISTEMI PERMISSIVI E NON MEDIANTE REAL-TIME PCR

Bonvicini F., Gallinella G., Manaresi E., Filippone C., Delbarba S., Gentilomi G., Musiani M., Zerbini M.

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

Scopo studiare la replicazione e l'espressione del parvovirus B19 in sistemi sperimentali in vitro, come modello per l'interpretazione delle interazioni virus-cellula in vivo.

Metodologie cellule permissive e non alla replicazione virale sono state infettate in vitro con parvovirus B19. Gli acidi nucleici e le proteine virali sono stati analizzati con metodi qualitativi e quantitativi a diversi tempi dopo l'infezione. In particolare, gli acidi nucleici virali, estratti dalle cellule infettate, sono stati analizzati mediante Real-Time PCR (sistema Light-Cycler Roche) utilizzando coppie di primer specifiche per il DNA e per le diverse classi di messaggeri virali.

Risultati le coppie di primer disegnate per la determinazione quantitativa del genoma virale e, in maniera selettiva, delle diverse classi di messaggeri virali, hanno consentito di identificare diversi livelli di replicazione e pattern di espressione del genoma virale. Sono state analizzate sia colture primarie derivate da midollo osseo e sangue cordonale, in cui è stata evidenziata la completa replicazione ed espressione del genoma, sia diverse linee cellulari in cui sono stati evidenziati diversi gradi di permissività per la moltiplicazione virale.

Considerazioni conclusive questi metodi per la quantificazione degli acidi nucleici virali, messi a punto su sistemi cellulari in vitro, potrebbero chiarire il ruolo del B19 in vivo, in quei quadri clinici, ad esempio, in cui è documentata la presenza del DNA virale ma in cui non è determinato il suo grado di espressione, in termini di replicazione, trascrizione e traduzione.

P163

VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI RECENTI MEDIANTE INDICE DI AVIDITA' ANTI-HIV

V.Bossi¹, C. Pasqualini², B. Suligoi³, C. Galli⁴

¹Virologia, Ospedale "Amedeo di Savoia", Torino;

²Servizio Sovrazonale di Epidemiologia, ASL 20, Alessandria

³COA-ISS, Roma;

⁴Abbott Divisione Diagnostici, Roma

La sorveglianza dell'infezione da HIV si basa sulla rileva-

zione delle “nuove” positività per anti-HIV, che però possono rappresentare vecchie infezioni non note in precedenza. In questo studio abbiamo adottato un nuovo indice sierologico (indice di avidità anti-HIV¹) per valutare la frequenza di infezioni recenti in pazienti sieropositivi.

Pazienti e metodi: lo studio è stato condotto su tutti i soggetti con nuova diagnosi di infezione da HIV (positività per anticorpi non rilevata in precedenza) pervenuti nell’arco di 9 mesi, da maggio 2003 a gennaio 2004. I campioni di siero sono stati testati per anti-HIV con AxSYM HIV1/2gO (Abbott Diagnostici); i campioni reattivi sono stati sottoposti a conferma con Western blot, e sui campioni positivi o indeterminati al WB è stato valutato l’indice di avidità (IA) con lo stesso test di screening, mediante analisi di due aliquote diluite 1:10 rispettivamente in guanidina e tampone. I risultati dell’IA sono stati confrontati con la intensità del segnale del test di screening (S/CO) e con i “patterns” di reattività in WB, un valore di IA $\leq 0,80$ è stato considerato discriminante per le infezioni recenti (< 6 mesi). **Risultati** Nel periodo di osservazione sono stati testati per anti-HIV 10.500 soggetti, e di questi 205 (2%) sono risultati “nuovi” reattivi al test di screening e positivi o indeterminati al WB. La valutazione dell’IA ha identificato 45 soggetti su 205 (21,9%) come “recenti infetti”. Un AI $\leq 80\%$ era rilevabile in tutti i soggetti con S/CO < 10 allo screening, nel 75% di quelli con S/CO tra 10 e 20, nel 18% di quelli con S/CO tra 20 e 30 e anche nel 4% di quelli con S/CO > 30 . Un WB indeterminato o un “pattern” WB con negatività per anti-gp41 (25/28; 89,3%) erano predittivi di un basso AI.

Conclusioni. Le infezioni recenti da HIV tra i “nuovi” positivi per anticorpi appaiono molto frequenti (22%); la valutazione dell’IA è semplice e appare più sensibile di una bassa reattività (≤ 20 S/CO) al test di screening, che avrebbe mancato di identificare almeno un terzo dei casi recenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Suligoi B. et al, J Clin Microbiol 2002; 43(11):4015-4020.

P164

RICERCA DI HPV-DNA MEDIANTE NESTED-PCR. NEI BRUSH LINGUALI DI SOGGETTI SANI

Caldarelli-Stefano R., Avezzu S., Molina V.

Laboratorio Analisi, CAM, Monza (MI),
sez. Diagnostica Molecolare,

Recentemente nel nostro laboratorio abbiamo isolato un papillomavirus umano (HPV) dall’epitelio linguale di un giovane adulto, fumatore accanito (oltre 2 pacchetti di sigarette/die) che presentava una proliferazione papillomatosa linguale diffusa, appartenente al gruppo dei genotipi ad alto rischio.

A seguito di questo ritrovamento, supportato da dati della letteratura che indicano che i papillomavirus causano tumori benigni nel tratto respiratorio, abbiamo deciso di indagare sulla presenza di HPV-DNA nelle sue possibili sedi di infezione, in particolare sulla lingua.

È stato quindi ricercato l’HPV-DNA in soggetti sani, suddivisi essenzialmente in due gruppi, fumatori e non fumatori, in quanto sembra che il fumo di sigaretta sia un fattore di rischio associato alla presenza di HPV.

In campioni di brush linguale è stata effettuata l’estrazione del DNA, a cui è seguita la ricerca di HPV mediante nested-PCR (‘home-made’) della regione L1 con primers consensus.

Nessuno dei 40 campioni fin’ora analizzati è risultato esse-

re positivo per la presenza di HPV sulla lingua.

Di questi, 38 appartengono alla categoria ‘non fumatori’ e solo 2 ai ‘fumatori’ (massimo un pacchetto di sigarette/die). Sono in corso di valutazione i soggetti fumatori.

Questi dati, ancora preliminari, sembrano dimostrare che l’HPV non sia ampiamente diffuso nella popolazione umana sana, a livello dell’epitelio linguale.

P165

PRESENZA DI HPV-DNA GENOTIPO 16 NELL’EPITELIO LINGUALE DI UN GIOVANE ADULTO ITALIANO: UN CASE REPORT

Caldarelli-Stefano R., Azzara A., Gironi A..

Laboratorio Analisi, CAM, Monza (MI),
sez. Diagnostica Molecolare,

I papillomavirus umani (HPV) sono virus oncogeni con uno spiccato tropismo per le cellule epiteliali squamose. Sono responsabili di lesioni cutanee benigne, come le verruche, o lesioni che possono evolvere in displasie severe e neoplasie, in particolare nell’epitelio cervicale, nella vescica o nella laringe. Descriviamo un caso di un giovane adulto, quarantenne, italiano, fumatore accanito, che presenta infezione da HPV diffusa. Il paziente è giunto alla nostra attenzione a causa di una fastidiosa papillomatosi presente sulla mucosa linguale. Dopo prelievo biotipico, la diagnosi istologica ha suggerito la presenza di papillomatosi con aspetti citopatologici da HPV.

Un brush linguale ha permesso la ricerca del DNA di HPV, e tramite nested-PCR (‘home-made’) della regione L1 con primers consensus, il campione si è rivelato positivo. La successiva tipizzazione genomica con ibridazione su strip (Innolia, Innogenetics) ha evidenziato la presenza del genotipo 16, considerato ad alto rischio.

Ad un’anamnesi più approfondita, il paziente ha rivelato di essere stato operato pochi anni prima di un ‘carcinoma ‘in situ’ della vescica, di cui purtroppo non è stato possibile analizzare il pezzo operatorio.

Un successivo prelievo di sangue periferico in contemporanea ad un nuovo brush linguale ha dimostrato in entrambi i campioni la presenza di HPV-DNA, dello stesso genotipo virale, dimostrando la diffusione sistemica del virus.

In definitiva, questi dati, pur non avendo conferma che il carcinoma vescicale presentasse HPV-DNA, dimostrano come l’infezione da papillomavirus non vada sottovalutata e che i pazienti che risultano positivi per un’infezione, anche seppur localizzata, devono essere seguiti nel tempo.

P166

FOLLICOLITE DA HERPES SIMPLEX VIRUS-TIPO 2: CASE REPORT.

Calvario* A., Scarasciulli M.L.*, Bozzi A.*, Ventola C.*, Seccia R.*, Caterina Foti^

* Laboratorio di Virologia, U.O. Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica II, Policlinico, Azienda Ospedaliera Policlinico Bari
^ Dipartimento di Medicina Interna, Immunologia e Malattie Infettive, U.O. Dermatologia, Azienda Ospedaliera Policlinico Bari

Herpes Simplex Virus (HSV) è un termine usato per descrivere un virus neurotrofico, a DNA, appartenente alla sottofamiglia degli α -herpesvirinae di cui si conoscono due sierotipi, HSV tipo 1 (HSV-1) e HSV tipo 2 (HSV-2). Entrambi i

sierotipi, pur presentando significative differenze genomiche, sono responsabili di patologie clinicamente simili e quindi di difficile interpretazione diagnostica; entrambi sono coinvolti in infezioni che interessano i tessuti mucocutanei, in particolar modo volto e genitali.

La cute integra oppone un'efficace barriera verso i virus erpetici che invece sono facilmente veicolati dalla presenza di soluzioni di continuo o lesioni di varia natura. In tali circostanze HSV produce generalmente infezioni modeste e autolimitanti. Discriminante è lo stato immunitario dell'ospite che influenza sia l'insorgenza che la severità dell'episodio infettivo.

Rari sono i casi di follicolite erpetica, in soggetti normali, riportati in letteratura nei quali peraltro non si precisa la natura eziologica di HSV probabilmente a motivo della mancanza di diagnostica differenziale.

L'introduzione di tecniche molecolari in campo virologico ha determinato una svolta nella diagnosi anche di casi di rara osservazione clinica e ad eziologia incerta.

Nel nostro caso, paziente immunocompetente di 52 anni affetto da follicolite ricorrente sulla guancia destra associata a intenso dolore, la ricerca del genoma virale con PCR ha permesso di identificare HSV-2 quale agente eziologico della patologia in esame.

Il paziente era affetto da tale patologia da sette anni, con episodi che in passato ricorrevano 2 volte l'anno, ma che di recente si manifestavano più frequentemente.

Esami batteriologici e micologici eseguiti su tamponi cutanei delle lesioni erano risultati negativi.

Nel luglio 2003 il paziente si è presentato ai clinici con una storia di eruzione follicolare da 5 giorni, dolore intenso e linfadenopatia della regione sottomandibolare sinistra. All'esame obiettivo si osservavano numerose lesioni follicolari senza presenza di vescicole e di segni tipici di infezione virale.

Il test di Tzanck era negativo. L'esame istologico mostrava leggera acantosi dell'epidermide e abbondante infiltrato perivascolare e perifollicolare nel derma adiacente alle aree in evoluzione suppurativa.

Sono state avviate indagini molecolari su campioni di siero, leucociti da sangue periferico (PBL), tamponi superficiali e sezioni istologiche paraffinate provenienti dalle lesioni del volto.

La ricerca di HSV-1, HSV-2 e VZV, i 3 virus erpetici presumibilmente coinvolti nel caso patologico in esame, è stata eseguita mediante l'utilizzo di nested PCR secondo i protocolli indicati dal Produttore Amplimedical Argene-Bioline.

L'analisi molecolare del siero e dei PBL è risultata negativa. Per quanto riguarda i tamponi superficiali e le sezioni istologiche provenienti dalle lesioni del volto sono entrambi risultati positivi per HSV-2.

Dopo trattamento antivirale specifico per via sistemica, si riscontrava guarigione delle aree lese e al follow-up di sei mesi il paziente non riferiva recidive.

Il caso riportato offre interessanti spunti di riflessione in quanto mostra come, anche in pazienti immunocompetenti, le lesioni da HSV-2 possono avere aspetti clinici atipici ed essere erroneamente confuse come infezioni batteriche o fungine. Pertanto la PCR sembra essere uno strumento diagnostico di grande ausilio per la diagnosi di infezione erpetica anche quando le caratteristiche cliniche e istologiche non appaiono suggestive di infezione virale.

P167

INFEZIONE CONGENITA DA CMV E SORDITA' NEUROSENSORIALE NELLA REGIONE PUGLIA.

Calvario A*, Scarasciulli M.L.*, Germinario C*,
Manziona M.[^], De Cosmo L.[^], Salonna I.[°], Bartoli R.[°],
Manigrasso V.[°], Papadia F.^{**}, Simonetti S.^{**}

*Dipartimento Medicina Interna e Medicina Pubblica -
U.O. Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica II,
Università degli Studi - Policlinico, Bari

[^]U.O. Neonatologia, Policlinico - Bari

[°] Dipartimento Oftalmologia e Otorinolaringoiatria - Sezione di
Otolgia e Audiologia U.O. ORL "G.Lugli",
Università degli Studi-Policlinico, Bari

^{**}Centro Regionale di Screening U.O. Malattie Metaboliche e
Genetica Clinica - ASL Giovanni XXIII-DiVenere-Bari

Nell'ambito di un co-finanziamento MIUR è stato condotto in Lombardia, Emilia-Romagna, Sardegna e Puglia uno studio volto a definire le caratteristiche epidemiologiche, virologiche e di impatto sulla sanità pubblica dell'infezione congenita da Cytomegalovirus (CMV) utili per la formulazione e la valutazione di interventi di prevenzione.

Relativamente alla popolazione pugliese ciò ha consentito di valutare la prevalenza dell'infezione congenita da CMV e la sua correlazione con la frequenza di sordità neurosensoriale (SNS), la più comune sequela dell'infezione.

Materiali e metodi

Fase prospettica.

Sono stati arruolati 1481 neonati nati nell'U.O. Neonatologia del Policlinico di Bari nel periodo 2002-2003.

Per ogni neonato è stata allestita in terza giornata la Guthrie Card analizzata presso il laboratorio di Virologia dell'U.O. di Bari mediante DBS test, una metodica innovativa che prevede estrazione del DNA di CMV dal sangue essiccato e successiva amplificazione in PCR.

In caso di positività, confermata mediante isolamento virale delle urine prelevate entro la terza settimana di vita, i neonati erano inseriti in un programma di follow-up audiologico per l'accertamento di danni uditivi tramite ABR.

Fase retrospettiva

Per lo studio retrospettivo, su segnalazione degli audiologi dello stesso nosocomio, il DBS test è stato eseguito su Card, recuperate dal Centro regionale di screening, appartenenti a bambini (età 3 mesi-5 anni) con sordità mono o bilaterale con soglia ≥ 40 dBHL.

Risultati

Per quanto riguarda lo studio prospettico, su 1481 Guthrie Card esaminate, 9 (0.6%) sono risultate positive al DBS test; nessun caso positivo è stato confermato con l'isolamento culturale su urine né ha manifestato infezione da CMV.

Per lo studio retrospettivo, su 17 bambini affetti da sordità neurosensoriale 9 (52.9%) presentavano DBS test positivo cui può essere attribuito il deficit auditivo riscontrato dagli specialisti. In 7 casi la perdita auditiva era bilaterale, in 5 casi con ABR assente e in 2 casi con ABR compreso fra 40 e 70 dBHL, rendendo necessario l'impianto cocleare o la protesì; gli altri 2 casi presentavano ipoacusia monolaterale con soglia maggiore o uguale a 70 dBHL.

I restanti 8 bambini ipoacustici con DBS test negativo, affetti da sordità bilaterale con ABR assente o ≥ 85 dBHL, risultavano asintomatici per CMV congenito ed erano giunti all'osservazione dei clinici per ritardo psicomotorio e del linguaggio; per 2 di questi è stata registrata familiarità per ipoacusia.

Considerazioni

La prevalenza dell'infezione congenita da CMV nella coorte

dei neonati screenati è risultata inferiore a quella registrata su territorio nazionale (1,61%0). Questo dato merita approfondimento poiché sembra non rispecchiare la realtà della intera regione: su 31 casi di neonati, nati nello stesso periodo dello studio, ospedalizzati in altri nosocomi regionali e giunti alla nostra attenzione, 10 sono risultati affetti da infezione congenita da CMV (dati in pubblicazione).

Per quanto riguarda invece la stima del ruolo dell'infezione congenita da CMV nell'eziologia della SNS, la frequenza è risultata pari al 52,9% relativamente alla totalità dei bambini sordi esaminati (9/17); di questi 4 erano senza causa di sordità o fattori di rischio noti, 4 presentavano sintomatologia severa per CMV (SGA, calcificazioni cerebrali, dilatazione ventricolare, ipotonia) e 1 sintomatologia misconosciuta per CMV.

P168

CORRELAZIONE FRA SIEROTIPO ED ANTIBIOTICORESISTENZE IN CEPPI DI *S. AGALACTIAE* D'ORIGINE BOVINA ED UMANA.

Calzolari M.¹, Polese A.², Bonilauri P.¹, Meriardi G.¹, Ricci L.², Nanetti A.³, Gonfalonieri M.⁴, Dottori M.¹.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna, sezione di Reggio Emilia.

²Laboratorio di Microbiologia A. O. "Santa Maria Nuova", Reggio Emilia.

³Laboratorio di Batteriologia A. O. "Sant'Orsola-Malpighi", Bologna.

⁴Laboratorio di Microbiologia A. O. "G. da Saliceto", Piacenza.

Streptococcus agalactiae può provocare mastite nei bovini e diverse patologie nell'uomo, in particolare meningiti neonatali. Sia i ceppi umani che bovini mostrano gli stessi antigeni polisaccaridici. Scopo della ricerca è stabilire quanto i ceppi di origine umana e bovina siano simili.

Sono stati testati in totale di 466 ceppi, 197 bovini, isolati in diverse sezioni dell'IZSLER, 269 umani, provenienti da 4 diversi ospedali emiliani (il 63,9% isolati da carriers e il 36,1% isolati da materiale patologico).

Di ogni ceppo è stata la individuata la MIC (Etest®) per sei antibiotici: benzilpenicillina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, cefalexina e trimethoprim più sulfamidico; inoltre sono stati tutti sierotipizzati tramite agglutinazione su vetrino (kit Denka-Seiken).

Sia la distribuzione dei sierotipi che la risposta agli antibiotici differenzia fortemente le due popolazioni.

Per quanto riguarda i ceppi umani il sierotipo predominante è il III (32%) seguito dal Ia (17,1%), nei ceppi bovini il sierotipo IV è di gran lunga il più abbondante (22,3%), seguito dal Ib e dal III (5,6%), inoltre fra questi ultimi si evidenzia un'alta percentuale di non tipizzabili (39,6%). Nessun ceppo è del VI e dell'VIII, 4 (uno dei quali bovino) sono del raro sierotipo VII.

Per quanto riguarda la risposta antibiotica tutti i ceppi sono sensibili alla benzilpenicillina. I ceppi umani mostrano percentuali maggiori di resistenti, in particolare alla tetraciclina, ma anche per gli altri antibiotici.

Sono emersi diversi fenomeni di multiresistenza, in particolare fra eritromicina, clindamicina e tetraciclina; inoltre fra tetraciclina e trimethoprim più sulfamidico.

Molto interessante è notare come alcuni sierotipi, in particolare il III e il V, mostrino, rispetto agli altri, maggiori percentuali di resistenti nella risposta semplice ad alcuni antibiotici e un maggior numero di ceppi multiresistenti. Occorre sottolineare che questi sierotipi sono stati anche indicati

come i più virulenti e diffusi nelle patologie umane provocate da *S. agalactiae*, in particolare nelle meningiti neonatali, inoltre il sierotipo V è, negli ultimi anni, in forte emergenza.

P169

DUE ANNI DI ESPERIENZA CON IL TEST NAT PER HCV/HIV-1. INCIDENZA PREVALENZA E RISCHIO RESIDUO IN PIEMONTE.

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

Dip.A-Medicina Trasfusionale, AO OIRM S.Anna- Torino.

Introduzione: In Italia lo screening NAT per la ricerca di HCV-RNA su tutte le unità di sangue trasfuse è obbligo di legge dal 29 Giugno 2002 (C.M 14 del 19.12.2001). Il Piemonte, recependo le raccomandazioni della C.M. 17 del 30.10.2000 e DGR 28-3449 del 9.07.2001, introdusse la ricerca di HCV-RNA nello screening trasfusionale a partire dal 1 Novembre 2001. In questo lavoro sono presentati i dati epidemiologici della popolazione di donatori afferenti ai SIT della Regione Piemonte dopo due anni dall'introduzione del test NAT.

Metodi: In Piemonte per lo screening NAT sono attivi 14 laboratori che eseguono la ricerca di HCV-RNA e HIV-1-RNA mediante due tecnologie diverse: Chiron Procleix e Roche Ampliscreen. Sono state calcolati per HCV e per HIV: l'incidenza, la prevalenza ed il rischio residuo RR.

Risultati: In due anni sono state testate 450000 unità di sangue per HCV-RNA e 300000 per HIV-RNA. La prevalenza per HCV è stata pari a 183,4/100000 donazioni nel 2002 e 139,4 nel 2003; mentre per HIV si sono registrati i seguenti tassi/100000 donazioni: 10,3 (2002) e 13,9 (2003). Nel 2002, l'incidenza di nuovi casi di infezione è stata di 1,86/100000 donazioni per HCV e di 0,83 per HIV; nel 2003 di 1,44 per HCV e di 1,28 per HIV per 100000 donazioni. Il RR calcolato nel 2002 è stato di 2,54/milione donazioni per HCV e di 0,96 per HIV; mentre nel 2003 di 1,87 per HCV e di 0,8 per HIV.

Conclusioni: questo è il primo lavoro in cui viene riportato il rischio residuo di trasfondere sangue infetto per HCV e/o HIV dopo due anni dall'introduzione del test NAT nello screening trasfusionale. I Tassi di incidenza e prevalenza nella popolazione di donatori in Piemonte sono confrontabili con quelli riportati dall'ISS per la regione estesa del Nord Italia.

P170

EXPRESSION OF p16INK4a IS A PROGNOSTIC FACTOR IN CERVICAL CANCER, RELATED TO GRADE OF CIN AND HIGH-RISK HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) BUT DOES NOT PREDICT VIRUS CLEARANCE AFTER CONE TREATMENT

Ciotti M., Paba P., Benedetto A., Branca M., Syrjänen K.¹, Favalli C.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica, Policlinico Universitario Tor Vergata

¹Istituto Superiore di Sanità, Laborotio di Epidemiologia e Biostatistica, Roma

Objective: One of the molecular mechanisms interfering

with the p16^{INK4a}/cyclin D/Rb pathway is inactivation of pRB through binding with E7 of the high-risk Human papillomavirus (HR-HPV). The role of p16^{INK4a} as a marker of HR-HPV and in diagnosis of CIN has been well established, but its predictive value in a) clearance of the virus after CIN treatment, and b) as a prognostic marker of cervical cancer was analysed for the first time.

Material and Methods: A series of 304 archival samples, including 125 squamous cell carcinomas (SCC) and 179 CIN lesions, were subjected to immunohistochemical staining for p16^{INK4a} antibody, and HPV testing using PCR with three primer sets (MY09/11, GP5'/GP6', SPF). Follow-up data were available of 71 SCC patients, and 67 of the CIN lesions had been followed-up with serial PCR after cone treatment.

Results: HR-HPV were closely associated with CIN (OR 19.12; 95%CI 2.31-157.81) and SCC (OR 27.25; 95%CI 3.28-226.09). There was a significant linear relationship between the lesion grade and intensity of p16^{INK4a} staining ($p=0.0001$). The expression of p16^{INK4a} was also closely related to HR-HPV ($p=0.0001$). p16^{INK4a} staining was a 100% specific indicator of CIN, with 100% PPV, and showed 83.5% sensitivity and 80.1% PPV in detecting HR-HPV. However, p16^{INK4a} staining did not predict clearance or persistence of HR-HPV after treatment of CIN. Importantly, p16^{INK4a} staining was a significant predictor of favourable prognosis in cervical cancer, both in univariate ($p=0.006$) and multivariate survival analysis ($p=0.003$). After adjustment for age, HR-HPV, and metastases in the Cox regression model, OR 0.219 (95%CI 0.083-0.580) indicates that positive p16^{INK4a} is highly protective against cancer death. This predictive power is equal to that ($p=0.003$) of distant metastases, which had a lower adjusted OR 2.98 (95%CI 1.463-6.074), however.

Conclusions: In our multivariate model (missing FIGO stage), the prognostic power of p16^{INK4a} was equal to that of distant metastases. Whether the prognostic value of p16^{INK4a} staining can compete with the known high predictive power of FIGO stage in cervical cancer, remains to be seen in controlled future studies.

P171

VACCINAZIONE ANTI-EPATITE B NEGLI ADOLESCENTI: ESITI DOPO 11 ANNI

A. Gabbuti¹, A. Degli Esposti¹, P.L. Blanc¹, C. Galli², F. Mazzotta¹

¹Malattie Infettive, Ospedale S. Maria Annunziata, Firenze;

²Abbott Divisione Diagnostici, Roma

Lo scopo del nostro lavoro è stato di valutare l'efficacia della vaccinazione e la persistenza di livelli protettivi di anti-HBs in una coorte di adolescenti dell'area fiorentina.

Pazienti e metodi: lo studio è stato condotto su 469 adolescenti (215 maschi e 264 femmine; età media 11,7 \pm 0,4 anni) vaccinati nel 1992; un mese dopo il completamento del ciclo vaccinale (3 dosi a T0, T1 e T6) i soggetti sono stati testati per anti-HBs (Ausab EIA, Abbott). Una prima verifica dei titoli di anti-HBs è stata effettuata con lo stesso metodo nel 1999, mentre nel 2003 sono stati valutati sia l'anti-HBs che l'anti-HBc con metodica MEIA (IMx Ausab e Core, Abbott). I valori di anti-HBs sono espressi da entrambi i metodi in mUI/mL, con livelli protettivi ≥ 10 .

Risultati: I valori di anti-HBs nel 1992 erano disponibili per 462 soggetti (98,5%); di questi, 351 (76%) sono stati controllati nel 1999 e 263 (56,9%) nel 2003. Nel 1992 tutti tranne uno presentavano livelli ≥ 10 di anti-HBs, l'80,2%

aveva livelli superiori a 1.000 mUI/mL e la media era di 4.880 mUI/mL. Dopo 7 anni, il 93,2% dei soggetti era ancora positivo per anti-HBs con titoli protettivi. Dopo 11 anni nessuno dei 262 soggetti controllati era positivo per anti-HBc, mentre il 91,3% era positivo per anti-HBs con valori >10 mUI/mL, e il 16,6% con livelli ≥ 1.000 . Il decremento medio di anti-HBs dopo 11 anni era di $1,41 \pm 0,47 \log_{10}$ 10 mUI/mL, ed era proporzionale ai livelli iniziali.

Conclusioni: in questa coorte di adolescenti la vaccinazione anti-HBV ha mostrato un'efficacia del 100%. Il calo dei livelli di anti-HBs è risultato correlato con il livello di picco rilevato un mese dopo la 3° dose di vaccino. Visti i complementi epidemiologici indotti dalla vaccinazione obbligatoria è necessaria la valutazione degli studi sulla memoria immunitaria per proporre o meno una dose di richiamo nei soggetti con <20 mUI/mL di anti-HBs, che erano il 12% del totale.

P172

DETERMINAZIONE DI HCMV IN PAZIENTI TRAPIANTATI; COMPARAZIONE TRA COBAS CMV MONITOR ROCHE, "IN HOUSE" REAL-TIME PCR E ANTIGENEMIA PP65

Biasiolo M.A., Campion L., Kraniotaki E., Mengoli C., Cusinato R.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche
UO Microbiologia e Virologia
Complesso Convenzionato
Azienda Ospedaliera-Università Padova

La diagnosi precoce delle infezioni da Cytomegalovirus (CMV) è uno dei principali obiettivi nel monitoraggio dei pazienti trapiantati. La ricerca quantitativa della viremia è uno dei parametri decisionali per l'inizio di terapia specifica ("preemptive therapy") e per il monitoraggio del successo terapeutico. Il metodo maggiormente impiegato è la ricerca dell'Ag pp65 nei leucociti polimorfonucleati del sangue periferico. Recentemente si sono affermati metodi molecolari per la determinazione della carica virale. In tale ambito presentiamo i risultati di uno studio comparativo tra **antigenemia pp65** e due metodi molecolari quantitativi, **Cobas Amplicor CMV Monitor (Roche)** ed **"in house" Real-Time PCR**.

Sono stati esaminati 154 campioni provenienti da 127 pazienti sottoposti a trapianto di organo solido (cuore, fegato, rene, polmone) e midollo. La determinazione dell'Antigenemia è stata fatta su preparati di 200.000 leucociti, mentre la CMV-DNA è stato quantificato su preparazioni di PBLs, ed il risultato veniva espressa come N° di copie genomiche/10⁶ cellule. L'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita manualmente, secondo protocollo, per Amplicor mentre per la Real-Time PCR si è ricorso ad un sistema automatizzato (stazione robotizzata multiprobe II HT exp. Perkin Elmer Lifescience). In RT-PCR la valutazione dell'idoneità dei campioni è stata confermata coamplificando con CMV-DNA un frammento genico della beta-globina.

Sono risultati positivi 27 campioni all'antigenemia, 38 con Cobas Amplicor e 54 con Real-Time PCR. Rispetto a pp65, Cobas Amplicor e Real-Time PCR hanno dimostrato valori di **concordanza del 92,9% e 82,5%, sensibilità 100% e 100%, specificità 91,3% e 78,7%, PPV 71,1% e 50% e NPV di 100% e 100%** rispettivamente.

I risultati ottenuti dimostrano la validità dei sistemi molecolari quantitativi indagati, soprattutto in termini di sensibilità, se paragonati a pp65. Il loro impiego nella routine diagnostica può risultare utile sia per una diagnosi precoce che nel

monitoraggio della terapia antivirale. Inoltre, l'introduzione dell'automazione nella diagnostica molecolare, specialmente per le fasi di estrazione, consente l'esecuzione di rilevanti carichi di lavoro con abbattimento dei costi.

P173

CMV INFEZIONE: TRAPIANTO ALLO-SCT MIELOABLATIVO VERSUS NON MIELOABLATIVO

Cuzzola M., Iacopino O., Irrera G., Console G., Penna G., Martino M., Melià A., Rigolino C., Morabito F., Iacopino P.

Centro Unico Regionale Trapianti di Midollo Osseo, Azienda Ospedaliera "B-M-M", Via Petrarca 11, 89100 Reggio Calabria

L'infezione da *Cytomegalovirus* (CMV) costituisce una delle maggiori complicazioni nel Trapianto Allogeneico di Cellule Staminali Ematopoietiche (Allo-SCT). Conseguentemente, la precocità della diagnosi ed il monitoraggio della replicazione virale rappresentano punti nodali per la sopravvivenza dei trapiantati. Negli ultimi anni, è aumentato il numero di interventi Allo-SCT non mieloablativi o a ridotta (RI) e minima (MI) intensità di condizionamento, nei pazienti non eleggibili ai trapianti mieloablativi o standard (ST).

Obiettivo. Confrontare l'incidenza della CMV infezione nei trapianti mieloablativi e non.

Pazienti e Metodo. Nel periodo 2000-2003, è stato studiato un gruppo di 78 pazienti sottoposti ad Allo-SCT provenienti da donatori HLA-identici, di cui 8 non familiari (MUD). I pazienti sono stati trattati secondo 3 differenti regimi di condizionamento: ridotta intensità (17 casi), minima intensità (23), ed intensità standard (38 casi, di cui 8 MUD). Dei 78 pazienti, 7 erano affetti da tumori solidi, gli altri da emopatie maligne. Il monitoraggio bisettimanale dell'infezione, si è basato sulla ricerca, mediante immunofluorescenza indiretta, della fosfoproteina strutturale pp65 espressa nei leucociti del sangue periferico e/o midollare, (mAb-p65 CINA pool, clone IC3-AYM; Argene.).

Risultati. L'antigene pp65 era positivo in 29 pazienti (37,2%), entro 100 giorni dall'infusione di SC (mediana 52). L'incidenza della CMV-infezione era più elevata nel gruppo Allo-SCT-ST vs RI e MI, ($p=.001$). In particolare, la positività per pp65 è stata dimostrata nel 100% dei pazienti Allo-SCT-ST MUD e nel 40% dei casi con donatore consanguineo. Per quanto riguarda i pazienti sottoposti a condizionamenti non mieloablativi, solo il 17,6% Allo-SCT-RI e il 20,7% Allo-SCT-MI hanno sviluppato infezione. In tutti i casi, trattati con ganciclovir, il tempo medio per la clearance virale è stata pari a 6 giorni.

Conclusioni. Questo studio suggerisce un minor rischio d'infezione citomegalica nei trapianti non mieloablativi, probabilmente dovuto al protettivo ruolo della quota residua dei linfociti T del ricevente.

P174

HCV AXSYM: PREDITTIVITA' RAPPORTO S/CO

Lo Cascio C., Maimeri G., Damiazzi L.

UOA Laboratorio Analisi ULSS20 VERONA

Alla luce delle raccomandazioni CDC, che suggeriscono di interpretare e refertare i risultati dei test HCV EIA mediante il rapporto campione/cut-off (S/CO), abbiamo valutato tale

rapporto utilizzando il kit AxSYM HCV 3.0 Abbott in relazione al risultato dell'immunoblot (IB) (Deciscan HCV PLUS Bio-Rad) e alla determinazione dell'RNA virale (effettuata presso altra struttura).

I dati ottenuti sono mostrati in tabella (non per tutti i campioni è stato possibile eseguire tutte le determinazioni):

HCV		IB			RNA		
n°	S/CO	n°	neg	nd	pos	n°	neg pos
31	<1					31	31
96	1-2,4	96	51	45	0	20	20
68	2,5-10	68	17	37	14	22	22
12	11-21	10	0	3	7	5	2 3
70	>21*	70	1 †	1 ‡	68		
65	22-70	19	0	0	19	48	13+1 34
78	>70	10	0	0	10	71	3+1 67

* eseguiti su altro strumento AxSYM

† S/CO = 25: non si hanno dati ulteriori sul soggetto

‡ S/CO = 44: non si hanno dati ulteriori sul soggetto

• soggetti con precedenti risultati positivi

In nessuno dei 31 pazienti con negatività di HCV, la ricerca di RNA è risultata positiva.

Per S/CO >21 si ha positività di IB nel 98%, pertanto è adeguata la scelta di tale cut off come limite oltre il quale refertare positivo il test MEIA senza ulteriori approfondimenti.

Per quanto riguarda la positività dell'RNA con S/CO >70 si ha una elevata probabilità di HCV RNA positivo (98% dei casi) mentre per S/CO 21-70 la percentuale di positività è del 72%.

Per S/CO <2.5 non si osserva nessuna positività all'immunoblot e per S/CO <11 nessuna positività dell'RNA.

Per S/CO 11-21 i dati sono pochi e distribuiti equamente tra RNA positivi e negativi, inoltre 2 dei 3 campioni RNA positivi sono IB indeterminati e 1 dei 2 negativi è IB positivo.

Sulla base di questi dati ci sembra pertanto che le procedure di approfondimento diagnostico possano essere, almeno in prima istanza, basate più sul valore del rapporto S/CO che non sulla esecuzione dell'IB.

P175

VALIDAZIONE DI UN PROTOCOLLO DI NESTED PCR SEMIQUANTITATIVA PER LA DETERMINAZIONE CONTEMPORANEA DELLA CARICA VIRALE DEL JCV E BKV

Bergallo M., Merlino C., Sinesi F., Burdino E., Piana F., Negro Ponzi A., Cavallo R.

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

I poliomavirus umani BK e JC (BKV e JCV) infettano oltre il 60% della popolazione umana. Dopo il superamento dell'infezione primaria, entrambi i virus rimangono latenti nel rene e nei linfociti B. Quasi tutte le patologie attribuibili al BKV ed al JCV si verificano in condizione di immunodepressione. A differenza del JCV che possiede neurotropismo, le patologie BKV-correlate sono fondamentalmente confinate al tratto urinario. I trapiantati renali sono suscettibili all'azione di questi due virus non solo come risultato della loro riattivazione, ma anche perché possono essere veicolati 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. In questi pazienti l'escrezione del virus nelle urine

ha un'incidenza del 5-45% e la replicazione massiva del BKV nell'epitelio tubulare risulta nella perdita dell'organo in circa il 3-5% di essi. Recentemente è stato ipotizzato che nei trapiantati renali alcuni casi di nefropatia possano essere associati al JCV. L'utilità clinica della PCR qualitativa è limitata dal momento che la sola presenza del DNA virale non può essere considerata indice diagnostico. Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto una metodica di nested-PCR semi-quantitativa allo scopo di valutare la carica virale sia del JCV che del BKV in questi pazienti per meglio valutare il ruolo patogenetico di questi due virus nell'insorgenza della nefropatia. Tale metodica si basa sulla valutazione comparativa degli amplificati virali con gli amplificati ottenuti da diluizioni scalari della stessa sequenza bersaglio (standard esterno). L'utilizzo della tecnica nested permette uno screening dei campioni negativi perché nella prima quantificazione si utilizzano primers comuni al BKV e JCV mentre con la seconda amplificazione, effettuata solamente sui campioni positivi, vengono quantificati il JCV e/o il BKV separatamente.

P176

UTILIZZO DI UNA METODICA D'ISOLAMENTO VIRALE RAPIDO NELLA DIAGNOSI D'INFEZIONE DA VIRUS RESPIRATORI.

*De Fina G., °Casini M., ^Zanon P., °Coser S., Pescolliderung L., *Lang A. e *Pagani E.

*Servizio Interaziendale di Microbiologia e Virologia,
°Dipartimento di Ematologia, ^Unità di Terapia Intensiva,
°Divisione di Oculistica, Dipartimento di Pediatria, Ospedale Centrale di Bolzano, Italia.

Lo studio condotto presso il Servizio Interaziendale di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Centrale di Bolzano ha valutato l'impatto dell'utilizzo di una metodica d'isolamento virale rapido (*shell vial*, SV) sulla diagnosi precoce d'infezione sostenuta da sette differenti virus respiratori.

Da ottobre 2003 a febbraio 2004, 15 lavaggi bronco-alveolari, 35 escreati, un tampone oculare e 24 lavaggi naso-faringei (tot=75) sono stati raccolti da pazienti ricoverati presso differenti reparti, con una clinica suggestiva per infezione da virus respiratorio. La presenza ed infettività dell'Adenovirus (Adeno), dei Virus dell'Influenza A e B (Flu A, Flu B), dei Virus Parainfluenzali 1, 2, 3 (Para1, Para2, Para3) e del Virus Respiratorio Sinciziale (RSV) è stata indagata utilizzando metodiche d'immunofluorescenza diretta (DFA), SV e coltura a lungo termine (LT). Le colture virali, sia SV sia LT, sono state allestite utilizzando una combinazione (R-Mix) di due differenti linee cellulari (A549, derivate da adenocarcinoma polmonare umano, e Mv1Lu, ovvero cellule epiteliali polmonari di visone), recentemente descritte per la loro permissività ai virus indagati e maggiore praticità se confrontate con le tradizionali linee cellulari convenzionalmente utilizzate. Per l'identificazione virale è stato in prima istanza utilizzato un *pool* anticorpale in grado di riconoscere simultaneamente gli antigeni dei diversi virus indagati. In caso di positività, i campioni sono stati indagati per la presenza dei singoli virus.

I risultati ottenuti hanno permesso d'identificare 21 ceppi virali (28% di positività), e cioè un Adeno, 3 FluA, un Para1, 3 Para3 e 13 RSV. In particolare la DFA ha consentito di rilevare la presenza virale in 15 casi, mentre la metodica SV e LT hanno permesso l'isolamento in 19, di cui 17 entro le 48 ore, e 6 casi rispettivamente.

Sulla base di tali osservazioni, riteniamo che l'associazione

del sistema SV/R-Mix con DFA sia di estrema utilità nell'ambito della diagnosi precoce d'infezione da virus respiratori.

P177

CONFRONTO TRA METODICHE PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI ANTI HERPES VIRUS DI TIPO 1 E 2 TOTALI E SINGOLI

Di Natale C., Fonio P., Tozzini M., Pellò M.G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Maggiore Novara

L'Herpes simplex è un virus incapsulato a DNA morfologicamente simile agli altri membri della famiglia degli Herpetoviridae. Esistono due tipi naturali di HSV che provocano infezioni nell'uomo di gravità variabile da lesioni cutanee lievi ad encefalite. L'HSV di tipo 1 (HSV-1) colpisce generalmente le membrane mucose dell'occhio, la bocca e le giunzioni mucocutanee del viso ed è anche causa di encefalite sporadica grave. L'HSV tipo 2 (HSV-2) è di solito associato a lesioni genitali mucocutanee. Poiché HSV-1 e HSV-2 presentano determinanti antigenici comuni, gli anticorpi diretti contro un tipo di virus possono dare reazioni crociate con l'altro tipo.

Lo scopo di questo lavoro è quello di riuscire a distinguere dopo aver dosato gli anticorpi totali anti HSV 1-2, a livello sierologico, gli anticorpi diretti verso HSV-1 da quelli diretti verso HSV-2 utilizzando test per la determinazione quantitativa di anticorpi specifici di classe IgG. I suddetti test impiegano la tecnologia della chemiluminescenza (CLIA). Per questi saggi sono stati utilizzati sieri di donne in gravidanza durante i loro normali controlli trimestrali e di pazienti ricoverati presso i reparti di medicina e di neurologia dell'Azienda Maggiore della Carità di Novara

P178

PREVALENZA DI SOTTOTIPI NON-B DI HIV-1 IN CAMPANIA

Di Nicuolo G.¹, Starace M.¹, Battisti S.¹, Pizzella T.⁴, Busto A.³, Glielmi G.², Battaglia M.¹.

¹Servizio di Virologia,

²3° Divisione di Malattie Infettive,

³4° Divisione di Malattie Infettive,

⁴8° Divisione di Malattie Infettive, A. O. "D. Cotugno", Napoli

Obiettivo Valutare la prevalenza dei sottotipi non-B di HIV-1 mediante analisi filogenetica del gene *pol* in soggetti con infezione da HIV-1 residenti nella regione Campania.

Materiali e metodi Sono stati inclusi nello studio 234 soggetti di nazionalità italiana, residenti nella regione Campania, sottoposti a sequenziamento del gene *pol* di HIV-1 per la determinazione della resistenza alla terapia antiretrovirale. E' stata effettuata la sequenza dell'intero gene delle proteasi e dei codoni 1-335 del gene della trascrittasi inversa mediante kit ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Abbott Laboratories) secondo le procedure raccomandate. Il sequenziamento del prodotto amplificato è stato effettuato mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide con ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem). 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 (Applied Biosystem). Le sequenze otte-

nute sono state sottoposte a saggio interpretativo di predittività di farmacoresistenza e ad analisi filogenetica del sottotipo mediante programma Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>).

Risultati L'analisi filogenetica effettuata sulla sequenza del gene *pol* di HIV-1 ha rivelato la presenza del sottotipo B in 219/234 (3,58%) e di sottotipi non-B in 15/234 (6,41%). I sottotipi non-B erano rappresentati da CRF02_AG 3 (1,28%), A 2 (0,85%), CRF01_AE 1 (0,42%), C 1 (0,42%), D 1 (0,42%), G 1 (0,42%) e dai sottotipi misti D (PR) / B (RT) 2 (0,85%), G (PR) / B (RT) 1 (0,42%), A (PR) / CRF01_AE 1 (0,42%), CRF02_AG (PR) / A (RT) 1 (0,42%), CRF01_AE (PR) / A (RT) 1 (0,42%). L'analisi filogenetica effettuata sulla sola sequenza del gene della trascrittasi inversa ha mostrato la presenza di sottotipi non-B 12/234 soggetti (5,12%): CRF02_AG 4 (1,70%), A 3 (1,28%), CRF01_AE 2 (0,85%), C 1 (0,42%), D 1 (0,42%), G 1 (0,42%).

La distribuzione dei sottotipi non-B nei soggetti con sieropositività per HIV-1 rilevata in epoca antecedente al 1999 è risultata del 2,84%, mentre nei soggetti con sieropositività rilevata negli ultimi cinque anni è risultata del 10,42%.

Conclusioni Questo studio mostra una bassa prevalenza dei sottotipi non-B in soggetti con infezione da HIV-1 nella popolazione autoctona della regione Campania, ma un significativo incremento nella prevalenza dei sottotipi non-B negli ultimi anni.

P179

CONFRONTO TRA SISTEMI IN AUTOMAZIONE. HIV-Ag/Ab-COMBO AxSYM (ABBOTT) VERSO ANTI-HIV-VITROS (ORTHO).

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

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

Obiettivo In questi anni diverse sono state le proposte delle Società Diagnostiche di sistemi per una migliore e precoce diagnosi di infezione da HIV. Nel nostro Istituto abbiamo valutato un test automatizzato che rileva contemporaneamente sia gli anticorpi che l'antigene p24 di HIV (AxSYM HIV Ag/Ab Combo Abbott), confrontandolo con la metodica da noi in uso (Vitros-Anti-HIV Ortho)

Metodologia Lo studio è stato effettuato mediante: a) comparazione di 520 campioni non selezionati; i campioni reattivi e/o discordanti sono stati analizzati ulteriormente con test di conferma western blot HIV-1/2 (Genelabs); b) analisi con AxSYM di 39 campioni con positività nota al test HIV-RNA; c) misurazione con AxSYM e Vitros del pannello commerciale PBR-108 BBI per 4 sessioni in giorni diversi; d) verifica per AxSYM della stabilità, nel tempo, della calibrazione con l'utilizzo di 4 controlli (un negativo e tre positivi).

Risultati Dei 520 campioni analizzati 519 sono risultati concordanti (511 non reattivi, 8 reattivi) e 1 discordante (test Chi quadro non significativo, concordanza tra metodi 99,8%, sensibilità e specificità di AxSYM verso Vitros 88,9% e 100% rispettivamente). La sensibilità nel gruppo dei 39 soggetti reattivi a diverse concentrazioni al test HIV-RNA è stata del 100%. La riproducibilità dei risultati è stata inferiore a 7% intrasaggio e 11% intersaggio. I 15 campioni del pannello sono stati classificati correttamente e con buona ripetibilità da entrambi i metodi con C.V. medio per AxSYM di 5,8% e per Vitros di 2,3%. L'analisi statistica della distribuzione dei risultati negativi ha evidenziato una deriva verso i valori positivi più per Vitros che per AxSYM; i coefficienti di Asimmetria e di Curtosi sono positivi e il rapporto deviazione standard su coefficiente è significativo.

Conclusioni Il test Vitros, al contrario di AxSYM, per mini-

me variazioni di anticorpo presente ha un'ampia variazione di segnale e migliora così la sensibilità del metodo pur, probabilmente, perdendo in specificità (il campione discordante era negativo al WB). Il test AxSYM, al contrario, cerca di migliorare la sensibilità del test con la contemporanea misurazione dell'antigene e degli anticorpi al fine di individuare precocemente l'avvenuta infezione senza perdere in specificità. In conclusione: il test AxSYM-Anti-HIV-Combo ha evidenziato caratteristiche analitiche confrontabili con il metodo in uso in routine e potrebbe, anche se non abbiamo potuto verificarlo in questo studio, rivelarsi vantaggioso nella rilevazione precoce dell'infezione HIV.

P180

MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS NEI PAZIENTI TRAPIANTATI D'ORGANO E DI MIDOLLO: CONFRONTO TRA L'ANTIGENEMIA E LA PCR REAL TIME.

Sassi M., Gabrielli L., Bellucci T., Lionetti G., Monari P., Lazzarotto T., Landini M.P.

U.O di Microbiologia, Laboratorio di Virologia, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Università degli Studi di Bologna, Bologna.

L'infezione da Citomegalovirus (CMV) rappresenta una seria minaccia per il buon esito del trapianto e per la stessa sopravvivenza del soggetto trapiantato. Il controllo della fase ematica dell'infezione citomegalica è utile per predire l'eventuale progressione verso la malattia e per monitorare l'efficacia della terapia antivirale.

In questo studio abbiamo valutato un nuovo sistema di PCR Real-Time per quantificare il genoma di CMV in campioni di leucociti polimorfonucleati (PMNL) provenienti da pazienti trapiantati d'organo e di midollo osseo.

Sono stati presi in considerazione 273 campioni di sangue periferico provenienti da 11 trapiantati di cuore, 8 di fegato e 5 di midollo. La ricerca quantitativa del DNA di CMV è stata condotta utilizzando un saggio di PCR Real Time (Q-CMV Real Time System - AMPLIMEDICAL). Le procedure di estrazione e amplificazione sono state eseguite come indicato nelle istruzioni operative del kit. I risultati sono stati espressi come n.copie/10⁵ PMNL.

Gli stessi campioni sono stati sottoposti al test dell'antigenemia, test utilizzato di routine nel nostro laboratorio.

Per la ricerca quantitativa del DNA di CMV nel sangue il sistema Real Time ha mostrato un'ottima sensibilità e specificità, in particolare:

- sia l'antigenemia che la PCR Real Time hanno ritrovato tutti i casi di malattia, con un valore di mediana di 0 giorni (antigenemia) e 18.5 giorni (Real Time) rispetto all'inizio dei sintomi.

- il trattamento antivirale determina a livello ematico un marcato decremento (>90%) o scomparsa del DNA di CMV.

- il possibile valore soglia proposto per l'inizio della terapia pre-emptive potrebbe essere di 3500-4000 copie/10⁵ PMNL.

P181

CONSIDERAZIONI SUL TEST DI SCREENING antiHIV ESEGUITO CON METODO AUTOMATICO IN CHEMILUMINESCENZA.

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

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

È noto che il test di screening per il dosaggio degli anticorpi antiHIV deve essere altamente sensibile per poter rilevare la presenza di anticorpi fin dalle prime fasi della sieroconversione, e altrettanto specifico per non dare adito a dubbi interpretativi. Scopo di questo lavoro è di verificare l'accuratezza dei risultati del test anti-HIV1/2 eseguiti sul sistema ORTHO Vitros ECi (cut off dichiarato ≥ 1). I dati riportati sono riferiti al periodo Gennaio 2002 – Dicembre 2002. Sono stati eseguiti 5020 test di screening anti-HIV sia col sistema ORTHO Vitros ECi sia col sistema BECKMAN Access. Sono risultati significativi per la nostra indagine 110 campioni in quanto reattivi o dubbi allo screening ECi. Sono stati inoltre eseguiti test di conferma quali Western Blot e/o p24 e/o HIV-RNA. Per meglio valutare l'accuratezza dei risultati ORTHO Vitros ECi i 110 campioni sono stati da noi suddivisi nelle seguenti classi. 1° classe: campioni non reattivi ma sopra la media dei negativi compresi tra 0.4 – 0.9 [7 campioni / 110 totali (6%)]; 2° classe: campioni reattivi compresi tra 1 – 9.9 [18 campioni / 110 totali (16%)]; 3° classe: campioni reattivi compresi tra 10 – 19.9 [5 campioni / 110 totali (4%)]; 4° classe: campioni reattivi ≥ 20 [80 campioni / 110 totali (74%)]. Dalla distribuzione di questi dati possiamo osservare come i risultati dubbi che cadono nella prima classe siano solo 7 (6%) mentre sono prevalenti i positivi franchi (74%). Dei 7 campioni appartenenti alla prima classe 5 sono stati confermati negativi mentre gli altri 2 sono stati refertati come deboli positivi: si trattava infatti di bambini nati da madre sieropositiva che stavano perdendo gli anticorpi materni. Dei 103 campioni risultati reattivi con il metodo ORTHO Vitros ECi, 6 sono stati refertati come negativi (6%) alla luce dei risultati dei test di conferma sopra indicati ed appartengono tutti alla 2° classe; mentre i restanti 97 campioni (94%) si sono confermati positivi. Inoltre in seguito al confronto con i dati forniti da ACCESS non è stato individuato nessun falso negativo. Alla luce dei risultati ottenuti possiamo affermare che il sistema ORTHO Vitros ECi per il dosaggio degli anticorpi antiHIV offre affidabili performance analitiche.

P182

CARATTERIZZAZIONE SIEROLOGICA DELL'INFEZIONE ACUTA E CRONICA DA HBV

C. Galli¹, A. Rodella², A. Gussago², D. Osmani²

¹Medical Marketing, Abbott Diagnostici, Roma

²III Laboratorio Analisi, Spedali Civili, Brescia

La diagnosi di infezione acuta da virus dell'epatite B (HBV) si basa classicamente sulla presenza di IgM anti-HBc, che però è di frequente riscontro, a bassi livelli, anche nelle epatiti croniche B. Per diverse malattie infettive, è ormai invalso l'uso di "datate" l'infezione mediante valutazione dell'indice di avidità degli anticorpi, e in questo studio abbiamo inteso valutare la possibile applicazione di questo parametro

nella diagnosi differenziale di infezione acuta da HBV, in associazione con criteri demografici e sierologici.

Pazienti e metodi. Abbiamo considerato due gruppi di pazienti ben caratterizzati da un punto di vista epidemiologico, clinico e sierologico: 15 casi di epatite acuta B e 75 casi di epatite cronica B, con follow-up di 1-4 anni. Per tutti i casi erano noti sesso, età e marcatori HBV (HBeAg, anti-HBe, anti-HBc/IgM). In un numero rappresentativo di pazienti dei due gruppi è stato inoltre valutato l'indice di avidità (IA) degli anticorpi anti-HBc, calcolato come rapporto del segnale generato da due aliquote di siero, diluite 1:10 rispettivamente in guanidina 1M e in tampone e analizzate con il test AxSYM Core.

Risultati. I pazienti con epatite acuta erano più giovani (età media: 37,9 anni contro 50,9), in maggioranza positivi per HBeAg (92,9% contro 21,3% nelle croniche) e tutti positivi per IgM anti-HBc, che erano rilevabili almeno in un prelievo nel 54,7% dei casi di epatite cronica. L'IA era $<0,8$ nel 66,7% delle epatiti acute e solamente nel 5,9% di 68 campioni da 16 pazienti con epatite cronica (media: 1,38).

Conclusioni: anche se è difficile operare una distinzione tra infezione acuta e cronica da HBV in base ai parametri rilevati su un singolo campione, i nostri dati indicano che l'associazione tra la positività per HBeAg, alti livelli di IgM anti-HBc e una bassa avidità per IgG anti-HBc hanno un valore predittivo positivo assai elevato per una diagnosi di epatite acuta B.

P183

STUDIO SU DONATORI DI SANGUE HCV / HIV1 POSITIVI PRESENZA / ASSENZA DI VIREMIA CONFRONTI RATIO CHLIA E RIBA SCORE.

Ghiazza P, Chiara M, Demarin G, Cornagliotto G, Albin L, Ricotti M, Demarchi G, Gariglio V, Martinelli A, Trivè M, Garofalo A, Lupo M, Palazzo M, Tea B, Massaro A.L.

Dip.A-Medicina Trasfusionale, AO OIRM S.Anna- Torino

Introduzione: Lo screening sui donatori di sangue viene condotto nel nostro laboratorio di sierologia con il sistema Abbott Prism dal 11.6.1998 per HBsAg, HIV, HCV e nel laboratorio di biologia molecolare con la tecnologia Chiron TMA per la ricerca di HIV1 Rna e HCV Rna (NAT test) a partire dal 4.11.2001. E' stato condotto uno studio su 190.000 donazioni di sangue provenienti da 50.000 donatori. Lo scopo di tale studio è stato valutare la percentuale di soggetti HIV1/ HCV positivi non-viremici, il pattern e lo score delle bande positive al test supplementare RIBA (ditta Ortho).

Metodo: Abbiamo comparato le Ratio ottenute con il Prism per i soggetti HIV1/HCV positivi e la presenza di bande al test RIBA confrontando i dati con i valori della viremia.

Risultati: la percentuale di HCV Ab positivi confermati non viremici è del 30% in accordo con i risultati internazionali su una popolazione di donatori selezionati mentre la popolazione normale riporta il 20%. I campioni HCV positivi confermati esprimono tutte le bande con una prevalenza di C33 al 92,8%, C22 al 90,4%, C100 al 59,5% e NS5 al 50%. All'interno di questo gruppo i donatori con livelli patologici di ALT ed Rna-positivi mostrano uno score di 4+ a tutte le bande. Nei campioni HCV positivi indeterminati si esprimono solo la C33 e la C22 al 50%. I test NAT mostrano una buona separazione tra negativi e positivi (tutti i positivi hanno Ratio >9) mentre il potere discriminatorio dei test Chlia è più basso nonostante una forte correlazione (100%) tra Ratio comprese fra 6-9 e positività al RIBA. Tale correla-

zione scende al 50% per Ratio comprese tra 3-6 E AL 10% PER Ratio tra 1-3.

Conclusioni: perchè continuare ad eseguire i test RIBA quando dallo screening si ottengono valori di Ratio superiori a 6?

P184

GENOTIPIZZAZIONE DI HPV A "LOCALIZZAZIONE GENITALE" CON METODO IMMUNOENZIMATICO (ELISA) E METODO DELLA IBRIDAZIONE INVERSA.

Giannattasio A., *Ricco C.S., Cuniato V., Falco E., Alterio A., Scancariello G., Galano G., Smeraglia R.

*Virologia P.O. "C. Ascalesi": Direttore Prof. Riccardo Smeraglia - A.S.L. Napoli I, * U.O.C. Ostetricia e Ginecologia P.O. SS. Annunziata Napoli - A.S.L. Napoli I*

I papilloma virus umani (HPV) rappresentano una delle cause più comuni di malattie sessualmente trasmesse. In rapporto all'associazione con lesioni precancerose e cancerose della cervice uterina, gli HPV vengono raggruppati in base al rischio oncogenico (basso, medio, alto).

Lo scopo del nostro studio è quello di porre a confronto due metodiche che consentono la genotipizzazione dell'HPV a localizzazione uterina: 1) screening, mediante metodo ELISA, della regione genomica L1 (Amplimedical SpA) 2) INNO-LiPA HPV Genotyping (Innogenetics SRL).

Lo studio in oggetto è stato effettuato su 10 pazienti, tra 18 e 50 anni, sessualmente attive e affette da patologia cervicale indotta da HPV. Ogni paziente è stata sottoposta al prelievo per lo screening e la tipizzazione virale e al Pap Test. Il genoma virale è stato estratto ed amplificato mediante PCR utilizzando una metodica dell'Amplimedical SpA. Le PCR che hanno dato esito positivo sono state sottoposte a genotipizzazione virale, utilizzando sia il Geno-Kit HPV L1 generale-ELISA (Amplimedical) sia l'INNO-LiPA HPV Genotyping (Innogenetics), basato sul principio della ibridazione inversa di parte della regione L1 del genoma dell'HPV.

Delle 10 pazienti sottoposte allo screening, 7 sono risultate positive all'HPV. I 7 campioni positivi, sottoposti a genotipizzazione virale con entrambe le metodiche, hanno dato i seguenti risultati: i campioni 1, 3, 4 e 7 erano positivi per il genotipo 16 con entrambe le metodiche; i campioni 2 e 6 risultavano non genotipizzabili con metodica Amplimedical e positivi per il genotipo 16 con metodica Innogenetics; infine il campione 5 risultava non genotipizzabile con metodica Amplimedical e positivo per i genotipi 11 e 52 con metodica Innogenetics.

I risultati ottenuti mostrano discordanze tra le due tecniche usate per la genotipizzazione dell'HPV. Ciò, verosimilmente, potrebbe essere dovuto all'esiguità dei campioni presi in esame. Pertanto sarà necessario confermare i dati ottenuti su un numero più congruo di campioni.

P185

RICERCA DI GENOTIPI DI PAPILOMAVIRUS GENITALI: CONFRONTO FRA DUE METODI MOLECOLARI

Grossini E., Nicosia A.M., Ravanini P., Fortina G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Maggiore Novara

In questo studio, sono stati messi a confronto due test del

commercio per la genotipizzazione degli HPV genitali: il test "INNO-LiPA HPV Genotyping" (Innogenetics) e i test "Geno-Kit HPV L1 Generale" e "Geno-Kit HPV L1 Alto Rischio" (Amplimedical).

L'abbinamento dei due test Geno-Kit HPV L1 di Amplimedical permette la tipizzazione di 10 differenti tipi virali, ritenuti dalla letteratura i più diffusi nella popolazione: 2 tipi a "basso rischio" (6 e 11), 4 tipi a "rischio intermedio" (33, 35, 52 e 58) e 4 tipi ad "alto rischio" (16, 18, 31 e 45). Il test INNO-LiPA permette invece la tipizzazione di 26 differenti tipi di interesse genitale: 4 ad "alto rischio" (16, 18, 31 e 45), 9 a "rischio intermedio" (33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 68) e 13 a "basso rischio" (6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 66, 70, 73 e 74).

In un primo gruppo sono stati analizzati in doppio, con entrambi i test considerati, 39 campioni di cytobrush cervicale risultati positivi per la ricerca di HPV-DNA (con test di amplificazione HPV Screening COMBI KIT Special - Amplimedical). In un secondo gruppo di campioni sono stati considerati i risultati provenienti da 106 campioni analizzati con i test Geno-Kit HPV L1 e da altri 124 campioni analizzati con il test INNO-LiPA.

Analizzando i risultati ottenuti nel primo gruppo di 39 campioni, si nota come la concordanza dei risultati è completa solo in 7 campioni su 39 (17,9%), mentre i due test risultano discordanti in 32 casi su 39 (82,1%). Questa discordanza appare parziale (almeno un tipo virale comune nel caso di coinfezioni riscontrate da uno o entrambi i test) nel 28,2% dei casi (11/39); mentre la discordanza è totale in ben il 53,8% dei casi (21/39).

In entrambi i gruppi, le differenze più importanti riguardano i genotipi a "basso rischio" (ben il 28,2% dei casi per il test INNO-LiPA e solo il 4,7% per i test Geno-Kit HPV L1); e per i genotipi a "rischio intermedio" (il 35,5% per il test INNO-LiPA contro il 10,4% per i test Geno-Kit HPV L1). Sovrapponibili appaiono invece le positività nel caso dei tipi ad "alto rischio" (35,5% dei casi per il test INNO-LiPA e 37,7% per i test Geno-Kit HPV L1).

P186

REATTIVITA' ANTI-HCV A BASSO LIVELLO CON TRE TEST DI SCREENING E UN TEST SUPPLEMENTARE: RILEVANZA E POSSIBILI CAUSE

A. Gussago¹, A. Rodella¹, S. Metelli¹, C. Galli²

¹*III Laboratorio analisi, Spedali Civili, Brescia;*

²*Abbott Divisione Diagnostici, Roma*

Una reattività anti-HCV a basso livello con i test di screening è un evento frequente e spesso non chiarito dai test di secondo livello, che indicano nella maggior parte dei casi una situazione di reattività rivolta verso antigeni di una sola regione di HCV. In questo studio abbiamo considerato da un punto di vista demografico e analitico i risultati "dubbi" per anti-HCV osservati nell'arco di 5 mesi.

Pazienti e metodi: sono stati considerati 150 campioni ottenuti da altrettanti pazienti (70 femmine; mediana età 60,5 anni e 80 maschi; mediana età 56 anni) tra settembre 2003 e febbraio 2004, di cui: a) 53 negativi "alti" (S/CO tra 0,50 e 0,99) al test di screening (AxSYM HCV 3.0); b) 94 con reattività a basso livello al test di screening (S/CO tra 1 e 10); 3 con reattività medio-alta al test di screening (S/CO >10) di cui 2 negativi al test supplementare. Tutti i campioni sono stati caratterizzati con il test supplementare Chiron RIBA-3 analizzati anche con altri due test per screening anti-HCV,

entrambi in chemiluminescenza, rispettivamente su Vitros (Ortho) e su Architect (Abbott).

Risultati: Dei campioni analizzati, 9 sono risultati positivi, 89 indeterminati e 52 negativi al RIBA-3. I due test Vitros e Architect erano apparentemente più specifici di AxSYM, a causa del "bias" di selezione iniziale, ma hanno mostrato diverse affinità; il test Vitros per anti-core (reattività sugli indeterminati: 55/55; 100%) e il test Architect per anti-NS3 (reattività sugli indeterminati: 16/17; 94,2%). I falsi positivi erano significativamente meno frequenti nei soggetti >65 anni (18% contro 44%; $p = 0,038$). Questi pazienti mostravano anche una maggiore frequenza di reattività anti-core e una minore frequenza di reattività anti-NS3, anti-NS4 e anti-NS5; le ultime due sono da ritenersi aspecifiche.

Conclusioni. Le reattività a basso livello per anti-HCV devono essere valutate tenendo conto dell'età dei pazienti. Nei giovani sono spesso false positività, probabilmente dovute a sostanze interferenti; negli anziani è molto probabile invece che si tratti di "code" di positività in seguito ad un'infezione in via di risoluzione, quadro che è apparso assai frequente (19% in 10 anni) in uno studio recente.¹

BIBLIOGRAFIA

1. Mazzeo C. et al, GUT 2003; 52: 1030-1034.

P187

STUDIO DELLE SOMIGLIANZE GENETICHE TRA ENTEROVIRUS UMANI E SUINI.

La Rosa¹ G.; Muscillo¹ M.; Sali¹ M.; De Carolis¹ E.; Cordioli² P.; M. Tollis³.

¹Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e dell'Emilia, Via A. Bianchi, 7 25125 Brescia.

³Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Sanità Alimentare ed Animale, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

Gli enterovirus suini, membri della famiglia *Picornaviridae*, sono responsabili di patologie di varia entità: infezioni asintomatiche, disordini neurologici, disordini di fertilità, gastroenteriti, pericarditi e miocarditi, lesioni del derma.

Originariamente classificati come enterovirus sulla base delle caratteristiche biologiche e fisico-chimiche, sono stati recentemente riclassificati, sulla base di studi molecolari, in tre gruppi: enterovirus suini A (sierotipo 8), enterovirus suini B (sierotipi 9 e 10) e un nuovo genere chiamato *Teschovirus* che include una singola specie con almeno 11 distinti sierotipi.

Alcuni sierotipi sono, in particolari regioni, geneticamente simili ad enterovirus umani soprattutto ai coxsackievirus pertanto possono creare problemi di interferenza nella diagnostica degli enterovirus umani, soprattutto in campo ambientale.

In questo lavoro, per verificare le somiglianze genetiche tra enterovirus umani e suini, sono state testate diverse coppie di primer di PCR su ceppi di virus isolati su linee cellulari primarie di rene suino e su ceppi di riferimento dell'ATCC (American Type Culture Collection).

Sono stati inoltre utilizzati come controlli RNA di SVDV (Swine Vesicular Disease Virus) e Coxsackievirus A9 (strain Griggs, ATCC).

In particolare, sono stati testati set di primer specifici per enterovirus suini per la regione del 5' non codificante, la regione conservata della RNA polimerasi RNA-dipendente e la regione terminale della proteina del capsido VP2 e set di primer specifici per enterovirus umani per la regione del 5' non codifi-

cante e la regione VP1 del capsido.

Lo studio delle similarità molecolari è fondamentale per la messa a punto di una diagnostica differenziale rapida e può dare indicazioni circa la possibilità di trasferimenti da umani ad animali e viceversa.

P188

MUTAZIONI NEL GENE HBV POLIMERASI ASSOCIATE A RESISTENZA ALLA LAMIVUDINA IN PAZIENTI CON EPATITE B

Leone R.A., Minchella P., Nisticò S., Potente G.I., Caruso D., Camerino M., Nicolazzo A., *Petronio A., Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, *U.O. Malattie Infettive, Azienda Sanitaria N. 6, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Scopo del lavoro.

Valutare la presenza di mutazioni associate a resistenza alla lamivudina nel gene che codifica la polimerasi HBV in pazienti con Epatite B Cronica (CH-B), monitorati presso la nostra U.O.. La lamivudina, analogo nucleosidico inibitore della trascrittasi inversa di HBV e quindi della replicazione virale, riduce rapidamente il livello sierico di HBV-DNA; la terapia prolungata oltre sei mesi, tuttavia, può determinare selezione di mutanti resistenti. La lamivudino-resistenza è associata a mutazioni nel codone 552 del gene POL, per cui nel sito attivo della trascrittasi inversa (YMDD), sequenza di Tirosina (Y), Metionina (M), Acido Aspartico (D), Acido Aspartico (D), la Metionina è sostituita con Isoleucina (YIDD) o Valina (YVDD). Recenti studi hanno dimostrato che tali mutazioni possono essere riscontrate anche in pazienti con CH-B mai trattati prima con antivirali.

Materiali e metodi.

Abbiamo considerato n. 40 pazienti con CH-B, 22 maschi e 18 femmine, con età media circa 43 anni, 22 dei quali in trattamento con lamivudina da più di un anno. Sono stati utilizzati i seguenti metodi: A) HBV-DNA: PCR quantitativa (Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche Diagnostics); B) Mutanti polimerasi: ibridazione inversa su strips di nitrocellulosa (LiPA), dopo amplificazione del domain B e C della regione HBV polimerasi, con sonde specifiche che rivelano mutazioni di resistenza genotipica nei codoni 528, 552 e 555 (INNO-LiPA HBV DR, Innogenetics).

Risultati. In 6 dei 22 pazienti in trattamento con lamivudina sono state individuate mutazioni; in particolare in 4 sono state rilevate popolazioni miste di ceppi selvaggio e mutanti (M552I) e (M552V / M552I) mentre in 2 solo popolazione mutata (M552I). In nessuno dei 18 pazienti mai trattati con antivirali è stata rilevata mutazione nel codone 552, tuttavia in 2 è stata riscontrata mutazione nel codone 555 (V555I) associata, secondo diversi studi, a resistenza al famciclovir, un altro analogo nucleosidico. Inoltre in nessuno dei 40 pazienti è stata rilevata mutazione nel codone 528.

Discussione e Conclusioni.

La precoce determinazione di mutazioni associate a resistenza farmacologica è di grande interesse clinico, soprattutto dopo l'introduzione di nuovi farmaci, alternativi alla lamivudina. In conclusione, un metodo rapido per la rivelazione di resistenza genotipica ai farmaci, sicuramente vantaggioso per programmare il regime terapeutico ottimale, può essere utilizzato in aggiunta alle altre procedure diagnostiche prima e durante la terapia.

P189

VALUTAZIONE DEL DOSAGGIO ABBOTT LCx HCV-RNA QUANTITATIVO

Malizia T.¹, Giannotti A.¹, Vanni M.¹, Lico S.¹, Avena S.¹, Comastri G.², Pulvirenti F.R.², Thamm S.³, Campa M.¹, Ceccherini-Nelli L.¹

¹Dipartimento di Patologia Sperimentale B.M.I.E., U.O. di Microbiologia Universitaria, AOUP, Pisa. Abbott Molecular Diagnostics, ²Roma, ³Wiesbaden.

Obiettivo.

Il crescente impiego di regole di interruzione della terapia basate sulla diminuzione dei livelli virali pre-trattamento, impone l'adozione di test che uniscano alla precisione un ampio range dinamico. Abbiamo valutato le prestazioni del dosaggio Abbott LCx HCV RNA Quantitativo, con range dinamico compreso tra 23 e 2.300.000 UI/mL, basato su estrazione con colonne QIAmp, RT-PCR competitiva e rilevazione automatica MEIA su analizzatore LCx (tempo totale di esecuzione di 24/48 campioni: 6/7 ore).

Metodi.

Accuratezza, precisione e linearità sono state stabilite con pannello Acrometrix (50, 500, 50.000, 500.000, 1.000.000 UI/mL) mediante 24 repliche per ogni livello (4 x 6 sessioni).

La riproducibilità è stata inoltre valutata sui controlli positivi basso ed alto (CP1 e CP2) del kit, analizzati in ogni sessione. 101 campioni di donatori di sangue, negativi per anti-HCV e HCV-RNA, sono stati impiegati per verificare la specificità. Per la correlazione sono stati analizzati 210 campioni retrospettivi selezionati dalla routine e testati con Cobas Monitor (range dinamico 600 - 500.000 UI/mL).

Risultati.

Il CV totale (log UI/mL) per il pannello era compreso tra 2,7% e 9,2 % e per CP1 e CP2 era di 4,3% e 3,4% rispettivamente. La retta di regressione lineare tra valori LCx (y) e attesi (x) era $y = 1,13x - 0,48$ ($R^2 = 0,9966$). La frequenza di rilevazione a 50 UI/mL è risultata del 52 % (12/23), mentre il 79% delle repliche a 1.000.000 di UI/mL, era nel range dinamico. La specificità era del 99% (100/101); l'unico campione inizialmente reattivo (26 UI/mL), era negativo alla ripetizione. 37 campioni (17,6% del totale) con risultato Monitor > 500.000 UI/mL, erano nel range dinamico di LCx, mentre solo 6 campioni (2,8%) erano > 2.300.00 con LCx e nel range con Monitor. 9 campioni < 600 UI/mL con Monitor, positivi al test qualitativo, erano dosabili con LCx (range 85-676 UI/mL).

Il coefficiente di correlazione r tra LCx e Monitor (74 risultati misurabili per entrambi) era 0,908. Nessun campione ha mostrato differenza superiore a 1 log (media Monitor-LCx = 0,03 log).

L'analisi delle differenze ha mostrato una tendenza del metodo LCx a fornire risultati più elevati per valori superiori a 5,5 log (circa 300.000 UI/mL).

Conclusioni.

Il test Abbott LCx HCV ha mostrato eccellenti precisione e linearità e una buona specificità. Il test ha correlato bene con il dosaggio di confronto, e il più ampio range dinamico si è tradotto - nella casistica analizzata - nel 19% circa in più di risultati refertabili (4% < 600 UI/mL e 15% > 500.000 UI/mL).

Sebbene basato su una RT-PCR convenzionale, il test può rappresentare un avanzamento nell'analisi di HCV-RNA, permettendo in teoria di utilizzare un unico dosaggio con duplice scopo qualitativo-quantitativo.

P190

MONITORAGGIO DI SOGGETTI CON EPATITE CRONICA DA HBV IN TERAPIA CON LAMIVUDINA: VALUTAZIONE DI DUE METODI PER LA RICERCA DI MUTAZIONI ASSOCIATE A RESISTENZA

Marcante R.; Panozzo P.; Pianalto N.; *Carlotto A.; °Colombo L.; Cavedon G.

Unità semplice di Virologia-Laboratorio Analisi O.C. SCHIO (VI)

* U.O. Malattie Infettive O.C. SCHIO

° Meridian S.r.l.

Il trattamento mediante lamivudina di soggetti con epatite cronica da HBV, se da un lato ha come iniziale effetto una rapida caduta del viral load e una normalizzazione delle transaminasi, spesso comporta la comparsa di mutanti resistenti al farmaco. Questo avviene soprattutto nei trattamenti di lunga durata anche se, nella nostra esperienza, periodi di 6-8-mesi di somministrazione del farmaco possono portare alla selezione di mutanti resistenti. Le mutazioni prevalenti sono localizzate in poche posizioni del gene della polimerasi e sono evidenziate dalle note sostituzioni aminoacidiche nei codoni 528 e 552. La frequenza e rapidità con cui tali mutazioni possono comparire rendono pertanto necessario un monitoraggio continuo della terapia mediante un utilizzo combinato di test per la determinazione del livello di viremia e la ricerca di eventuali mutazioni. In questo studio sono riportati i risultati del follow-up di 9 pazienti maschi, di età compresa tra 29 e 78 anni, in terapia con 100 mg x 2/die di lamivudina per epatite cronica da HBV. Il viral load è stato eseguito ogni due mesi dopo l'inizio del trattamento mediante il test quantitativo **affigene HBV VL (Sangtec Molecular Diagnostics)** assieme alla determinazione di altri parametri biochimici tra i quali le transaminasi. In tutti i pazienti abbiamo osservato una iniziale caduta del livello di viremia al di sotto del limite di sensibilità del metodo assieme alla normalizzazione delle transaminasi. Nei 7 pazienti in cui si è osservato un ritorno alla positività del livello di viremia è stata eseguita la ricerca di mutanti resistenti con l'impiego di due diversi metodi commerciali: **INNO-LiPA HBV DR (Innogenetics)**, basato su una reazione di ibridizzazione inversa, e **affigene HBV DE/3TC (Sangtec Molecular Diagnostics)** che utilizza una nuova tecnologia di minisequenziamento su micropiastra e rivelazione immunoenzimatica. In tutti questi pazienti è stato possibile dimostrare la presenza, con entrambi i metodi, di una o più mutazioni nei codoni 528 e 552 in presenza di livelli anche bassi di viremia e in alcuni casi con transaminasi ancora nella norma. Le mutazioni in questi pazienti sono comparse tra 6 e 12 mesi dall'inizio della terapia. Dopo sospensione della terapia si è assistito ad un rapido aumento della viremia in tutti i pazienti. I due test per la ricerca di mutanti resistenti eseguiti su campioni prelevati 3-4 mesi dopo la sospensione della terapia hanno invece fornito risultati discordanti. In tutti i campioni il test INNO-LiPA HBV DR ha evidenziato un completo ritorno al fenotipo selvaggio mentre il test affigene HBV DE/3TC rivelava ancora la presenza di fenotipo mutato in 4 di questi facendo ipotizzare una maggiore sensibilità del test affigene nel rilevare una più piccola percentuale di popolazione mutata. Entrambi i tests sono risultati determinanti, assieme al dosaggio del viral-load, nella precoce individuazione di mutanti resistenti e la loro utilità diagnostica potrebbe ulteriormente aumentare con l'impiego di nuovi farmaci (adefovir) che sembrano dare promettenti risultati nel limitare la replicazione di ceppi mutati resistenti alla lamivudina.

P191

RICERCA DI HPV SU SISTEMA THINPREP E TIPIZZAZIONE MEDIANTE IL TEST INNO-LiPA HPV GENOTYPING

Marcante R.; Panozzo P.; Pianalto N.; Cavedon G.

Unità Semplice di Virologia-Laboratorio Analisi O.C. SCHIO

La ricerca di HPV è stata eseguita su 307 campioni prelevati da donne con anomalie citologiche al pap-test (Ascus, LSIL, HSIL). L'estrazione del DNA (CLEAN DNA, A.B. ANALITICA, PD.) è stata eseguita partendo dallo stesso materiale prelevato per l'esecuzione del pap test con il sistema per la citologia in fase liquida (ThinPrep). La amplificazione è stata effettuata mediante un sistema di PCR che utilizza i primers degenerati MY09/11, in grado di amplificare una sequenza di 450 b.p appartenente alla regione L1 di HPV (Ampliquity HPV, A.B. ANALITICA, PD.) Su tutti i campioni è stata inoltre amplificata la b-globina per verificare la adeguatezza del materiale estratto. Solo 5 campioni sono risultati non idonei all'amplificazione di HPV. I campioni evidenziati come positivi sono stati pertanto 59 su 302 (19.5%). La percentuale di positività è stata rispettivamente del 13.9% nei campioni con ASCUS e del 58.38% nei campioni con lesioni di basso e alto grado. La tipizzazione degli isolati di HPV è stata eseguita mediante analisi di restrizione del frammento amplificato utilizzando 3 enzimi (RsaI, HaeIII e PstI). Le corse elettroforetiche su Metaphor agar sono state analizzate mediante analisi di immagine su sistema Gel Doc 2000. Quaranta campioni positivi per HPV sono stati inoltre tipizzati con il sistema commerciale INNO-LiPA HPV Genotyping (INNOGENETICS) che prevede la amplificazione di un frammento di 65 b.p. nella regione L1. Gli ampliconi biotinilati e denaturati, sono stati ibridati con probes immobilizzati su strisce di nitrocellulosa specifici per 22 differenti genotipi di HPV. Il confronto tra i due sistemi di identificazione di HPV ha permesso di trarre alcune considerazioni: 1) I due sistemi concordano nei campioni in cui è presente un solo genotipo. 2) Il sistema INNO-LiPA sembra evidenziare un maggior numero di infezioni miste alcune delle quali non riscontrate con l'analisi di restrizione. 3) L'analisi di restrizione è difficilmente interpretabile nel caso di infezioni miste. 4) L'analisi di restrizione non permette di identificare il genotipo nei campioni con debole banda di positività allo screening mentre il test INNO-LiPA è in grado di fornire il genotipo anche su questi campioni. 5) Alcuni campioni positivi al test di screening sono risultati non tipizzabili con il sistema INNO-LiPA.

P192

CYTOMEGALOVIRUS IGG AVIDITY: VALIDITÀ DEL TEST PER LA DETERMINAZIONE DELLO STATO CLINICO DEL PAZIENTE.

Mazzarelli G.*, Parri F.*, Dal Maso G.**, Paoli C.**

*Laboratorio di Sieroimmunologia A.O.U.C. Careggi
viale Pieraccini 17 Firenze

** Dienes S.p.A. via delle Rose 10 53035 Monteriggioni Siena

Il significato diagnostico e l'importanza della determinazione dell'avidity degli anticorpi IgG verso un determinato antigene sono oramai noti da tempo. Con il presente studio si intende valutare le prestazioni del Kit Enzywell

Cytomegalovirus IgG Avidity (Dienes) con su campioni di siero pervenuti presso il Laboratorio di Sieroimmunologia con richiesta di ricerca di anticorpi anti Cytomegalovirus. 207 sieri sono stati testati, di questi si conosceva la storia clinica del paziente, il reparto di provenienza e i risultati ottenuti con i kit Vidas IgG e IgM (Biomérieux); i campioni risultati IgM positivi venivano ulteriormente testati con il kit Enzygnost Anti CMV /IgM (DADE Behring).

In base alle suddette informazioni i 207 sieri sono stati suddivisi in 4 distinti gruppi di appartenenza:

Pazienti con infezione pregressa. (n=166)

Pazienti trapiantati renali (n= 19)

Pazienti con infezioni primarie (n= 17)

CMV IgM Falsi Positivi (n=5)

I gruppi 1 e 4 mostravano valori di Avidity compresi tra 50 e 99%. Nel gruppo 3 l'avidity rilevata variava da un minimo di 6 ad un massimo di 35%; nel gruppo dei pazienti trapiantati i valori di avidity erano maggiori del 50% in tutti i soggetti.

I dati ottenuti confermano le buone prestazioni del kit discriminando correttamente i pazienti con infezione acuta in atto da quelli con infezione pregressa, con valori di avidity che aumentano con il passare del tempo dalla fase acuta dell'infezione.

Il test si conferma nella sua utilità nel caso di reazioni aspecifiche in IgM.

La determinazione dell'avidity degli anticorpi IgG anti Cytomegalovirus nei pazienti trapiantati, è risultata di relativo significato diagnostico.

P193

DIAGNOSI RAPIDA DI INFEZIONE DA ADENOVIRUS UMANI MEDIANTE REAZIONE POLIMERASICA A CATENA DI TIPO NESTED.

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

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

Gli adenovirus umani causano una grande varietà di sindromi cliniche che comprendono, tra le più frequenti, enterite e malattia respiratoria acuta come pure congiuntivite. I metodi avanzati di amplificazione genica offrono una vantaggiosa alternativa ai metodi considerati ormai tradizionali (coltura cellulare, microscopia elettronica-ME, immunofluorescenza-IF, agglutinazione al lattice e saggio immunoenzimatico) per la rivelazione di adenovirus nei campioni clinici.

In questa nota vengono riferiti gli esiti delle prime prove per la valutazione di un saggio diagnostico commerciale ("Adenovirus-oligomix", Amplimedical, Italia) per l'amplificazione mediante nPCR di un frammento genomico codificante per l'esone capsidico di adenovirus.

La specificità dei "primers" è stata dimostrata dall'esito negativo ottenuto dal saggio di 14 campioni clinici contenenti virus diversi da adenovirus che possono infettare gli apparati respiratorio e intestinale e l'occhio.

L'nPCR ha rivelato DNA di adenovirus in 5 di 39 (12,8%) secrezioni respiratorie, 6 di 22 (27,3%) feci e nessuno di 2 (0%) tamponi congiuntivali appartenenti a pazienti pediatrici ricoverati in gennaio 2004 con sindrome respiratoria, gastroenterica o congiuntivite, rispettivamente, risultati negativi per altri virus mediante metodo colturale e/o IF sulle secrezioni respiratorie e/o ME sulle feci.

Dal confronto degli esiti ottenuti mediante questi ultimi metodi per la rivelazione di adenovirus, l'nPCR ha dimostrato maggior sensibilità sia del metodo colturale (5 vs 2 secrezioni respiratorie positive e 6 vs 4 feci positive) sia dell'IF (5 vs 0 secrezioni respiratorie positive) e della ME (6 vs 2 feci positive). Complessivamente l'nPCR ha consentito di porre diagnosi di infezione nel 7,7% e nel 9,1% in più rispetto all'impiego in diversa combinazione dei metodi tradizionali sulle secrezioni respiratorie e sulle feci, rispettivamente. In conclusione, dalle prime prove condotte l'nPCR sembra essere utile per una diagnosi rapida di infezione da adenovirus con una sensibilità maggiore dei metodi correntemente in uso, almeno nelle infezioni respiratorie ed enteriche in età pediatrica. I risultati verranno discussi anche in relazione agli esiti della determinazione del limite di rivelabilità del saggio.

P194

EPISODIO EPIDEMICO NOSOCOMIALE DI ENTERITE SOSTENUTO DA NOROVIRUS IN PAZIENTI PEDIATRICI RICOVERATI.

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

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

All'inizio di febbraio 2004 presso l'U.O. di Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma sono state osservate nello stesso giorno alla microscopia elettronica particelle calicivirus-simili in 2 campioni di feci (in un caso associate a particelle reovirus-simili) appartenenti ad altrettanti piccoli pazienti colpiti da enterite alcuni giorni dopo il ricovero per patologie a carico di apparati diversi dall'intestino.

Per verificare la presenza nei reparti pediatrici di un possibile focolaio epidemico di enterite da norovirus, è stata condotta la ricerca dell'RNA virale mediante RT-PCR sia sui campioni di feci appartenenti a pazienti pediatrici ricoverati con sindrome gastroenterica acuta e pervenuti presso l'U.O. di Virologia per indagini virologiche nel corso del mese di gennaio e conservati congelati, sia prospetticamente su quei campioni che hanno presentato le stesse caratteristiche nella settimana successiva al ritrovamento iniziale.

Di 53 bambini esaminati, 14 (26,4%) hanno rivelato la presenza dell'RNA virale nelle feci. Di questi ultimi è stato riscontrato che in 6 casi, inclusi i due primi sospetti di infezione nosocomiale, l'enterite è comparsa almeno 24 ore dopo il ricovero per altre patologie e in tutti i casi tranne uno (5 casi su 6) nell'arco di quattro giorni. L'analisi delle sequenze dei ceppi virali rivelati ha dimostrato che 13 appartenevano allo stesso genotipo.

Sulla base dei dati anamnestici e clinici e in relazione alla caratterizzazione molecolare dei ceppi è molto probabile che alcuni pazienti ricoverati per sindrome gastroenterica siano stati la sorgente del focolaio epidemico da norovirus.

Gli autori concludono evidenziando l'importanza epidemiologica dell'infezione nosocomiale sostenuta da norovirus e suggeriscono che una diagnosi rapida e precoce di infezione è indispensabile per ridurre la diffusione dell'enterite nei reparti pediatrici attraverso il tempestivo rafforzamento delle misure di controllo. I risultati verranno discussi anche in relazione agli esiti delle indagini per il completamento della sorveglianza al fine di definire l'estensione dell'episodio epidemico nosocomiale.

P195

PREVALENZA DI INFEZIONE DA ROTAVIRUS, ADENOVIRUS ED ASTROVIRUS IN PAZIENTI CON GASTROENTERITE ACUTA

Minchella P., Leone R.A., Nisticò S., Potente G.I., Caruso D., Camerino M., Nicolazzo A., Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, Azienda Sanitaria N. 6, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Scopo del lavoro.

Valutare la prevalenza di infezione da Rotavirus, Adenovirus ed Astrovirus nei pazienti sintomatici per gastroenterite, afferenti alla nostra U.O. per indagini virologiche su campioni fecali.

La gastroenterite virale acuta rappresenta nei paesi industrializzati una delle più frequenti cause di morbidità nell'età pediatrica, con elevato costo sociale per cure mediche ed eventuali ricoveri ospedalieri.

I virus riconosciuti come più importanti agenti eziologici sono Rotavirus di gruppo A, Adenovirus tipo 40 e 41, Astrovirus e Calicivirus.

Sono soprattutto i Rotavirus responsabili delle forme più gravi e disidratanti, coinvolti nel 30-35% delle ospedalizzazioni per diarrea nell'infanzia.

Negli adulti la sintomatologia è generalmente modesta, ma infezioni più serie sono descritte in anziani ed immunodepressi.

Materiali e metodi.

Sono stati esaminati negli anni 2000-2003 campioni di feci pervenuti da 530 pazienti sintomatici, 287 maschi e 243 femmine, per la ricerca diretta di Rotavirus, Adenovirus ed Astrovirus.

Sono stati utilizzati i seguenti tests basati su tecnica immunoenzimatica (EIA), tutti della Ditta DakoCytomation: IDEIA Rotavirus che utilizza anticorpi policlonali, IDEIA Adenovirus con anticorpi monoclonali ed Amplified IDEIA Astrovirus, test di nuova generazione con tecnologia di amplificazione del segnale.

I campioni sono stati suddivisi in due gruppi in base all'età dei pazienti: 480 campioni di adulti e 50 di soggetti in età pediatrica.

Risultati.

Tra i 480 campioni di pazienti adulti è stata riscontrata positività ad almeno un test nel **4,79%** dei casi (n. 23); in particolare nel **3,54%** positività per Rotavirus (n. 17), **0,63%** per Adenovirus (n. 3) ed anche **0,63%** per Astrovirus (n. 3). Invece tra i 50 campioni di pazienti pediatrici è stata riscontrata positività nel **28%** dei casi (n. 14); in particolare nel **20%** positività per Rotavirus (n. 10), **4,0%** per Adenovirus (n. 2) ed anche **4,0%** per Astrovirus (n. 2). Soltanto in un paziente adulto è stata trovata positività contemporanea per Rotavirus ed Adenovirus.

Discussione e Conclusioni.

Dai dati ottenuti nel nostro studio si può concludere che la più importante causa di gastroenterite di origine virale è rappresentata dai Rotavirus di gruppo A, soprattutto nella popolazione pediatrica, essendo stato confermato il sospetto diagnostico con la positività della ricerca diretta nel 20% dei campioni.

Nonostante la manifestazione clinica e la fascia d'età interessata spesso già indirizzino la diagnosi, è comunque utile e vantaggiosa, anche ai fini epidemiologici, una diagnosi eziologica con la rilevazione diretta degli antigeni virali mediante un test EIA di semplice utilizzo.

P196

STUDI FILOGENETICI DI ADENOVIRUS CIRCOLANTI IN ITALIA E LORO IDENTIFICAZIONE IN CAMPIONI D'ACQUA ARTIFICIALMENTE CONTAMINATA.

Muscillo¹ M.; La Rosa¹ G.; De Carolis¹ E.; Sali¹ M.; Manzara² S. e G. Fadda².

¹Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

²Università Cattolica Sacro Cuore Istituto di Microbiologia, Largo F.Vito 1, 00168 Roma.

Gli adenovirus sono un gruppo estremamente eterogeneo e diffuso di virus che provocano malattie prevalentemente a carico dell'apparato respiratorio sia nell'uomo che negli animali. Sono noti due generi: i mastadenovirus, con 9 gruppi che infettano l'uomo ed altri mammiferi e gli aviadenovirus con 5 gruppi che infettano gli uccelli, per un totale di 120 differenti virus di cui 47 sierotipi isolati dall'uomo. Sono trasmessi attraverso vie oro-fecali piuttosto che respiratorie. Hanno dipendenza stagionale e colpiscono bambini in età scolare durante il periodo estivo ed i militari di leva nel periodo invernale con febbri faringo-congiuntivali. Non vi sono dati recenti sui sierotipi circolanti in Italia né si hanno dati sulla loro presenza nell'acqua destinata alla balneazione. Questi dati sono essenziali per la revisione, in sede comunitaria, delle normative riguardanti i parametri virologici delle acque di balneazione. Ceppi di adenovirus, isolati su cellule Hep2 infettate con tamponi faringei o fecali provenienti da pazienti afferenti al Policlinico A. Gemelli di Roma, sono stati tipizzati mediante metodi sierologici. Successivamente il DNA estratto dai lisati cellulari, è stato analizzato mediante PCR in diverse regioni dell'esone. Gli ampliconi, da 300 a 680 bp, sono stati purificati e sequenziati su sequenziatore a capillare ABI310. Come controlli positivi sono stati utilizzati ceppi di adenovirus 40 e 41 dell'ATCC. Tra i ceppi esaminati, l'adenovirus 1 e 2 sono risultati tra i più frequenti.

L'identificazione degli adenovirus mediante PCR è risultata possibile anche quando è stato esaminato un campione di 100 µl proveniente dalla originaria contaminazione di 10 L di acqua distillata prima infettati con 10^2 - 10^5 TCID₅₀ di adenovirus 40 e poi sottoposti a concentrazione su membrana a flusso tangenziale. La presente metodologia può avere applicazioni utili in campo epidemiologico, clinico ed ambientale.

P197

IL RUOLO EMERGENTE DEL VIRUS TOSCANA NELL'Eziologia DELLE MENINGITI ESTIVE NELLE MARCHE

Pauri P.^{1,2}, Marinelli K.¹, Balercia M.¹, Tomassini T.¹

¹UO Virologia, AO Ospedali Riuniti, Ancona;

²Gruppo di Lavoro AMCLI CoSV "Infezioni virali del Sistema Nervoso Centrale"

Scopi: Scopo del presente lavoro è stato quello di esaminare i dati raccolti nel quinquennio 1999-2003 per descrivere la circolazione ed il peso del virus Toscana nelle Marche in 665 casi di meningiti asettiche estive ricoverate in ospedali della regione, sottoposti anche alla ricerca eziologica per un pan-

nello di virus neurotropi (HSV 1-2, VZ, Morbillo, Parotite, Enterovirus), eventualmente esteso, dopo contatti con i Clinici, ad altri agenti (CMV, EBV, Adenovirus, HHV6) per un totale di 1058 campioni esaminati. In particolare è stato indagato il ruolo della ricerca di IgG e IgM anti virus Toscana rispetto alla ricerca dell'RNA su liquor c.s.

E' già stato ampiamente dimostrato che una diagnosi eziologica rapida delle patologie acute da virus neurotropi è estremamente vantaggiosa sia per la gestione e per la prognosi del singolo paziente, sia dal punto di vista dei costi-benefici, in quanto la diagnosi di infezione da virus Toscana permette di dimettere prima il paziente, evitando il ricorso ad una serie di esami costosi e riducendo l'uso di antibiotici non necessari.

Risultati: Lo studio effettuato dimostra un pesante ruolo del virus Toscana nella eziologia delle meningiti estive a liquor limpido nelle Marche, ruolo che risulta in aumento nel corso degli anni, a partire da un 28% nel 1999 fino al 53,7% del totale dei casi nel 2003. I casi con compromissione encefalica rappresentano il 6%.

Per quanto riguarda la distribuzione dei casi nei diversi mesi estivi si osserva la massima incidenza nei mesi di luglio e agosto, ma anche una deriva dei casi nei mesi di settembre e ottobre.

La presenza di IgM sieriche ha permesso la diagnosi nel 98% dei casi, la presenza di IgM liquorali nel 97,5% e la presenza di RNA virale nel 100%, a conferma del fatto che la ricerca di RNA su liquor è un marker precoce ed affidabile.

Conclusioni: La costruzione con i colleghi infettivologi del nostro Dipartimento di Malattie Infettive e Microbiologia di un Profilo di assistenza per la gestione del paziente affetto da meningite o meningo-encefalite, orientata ai criteri della Medicina basata sulle Evidenze, ha permesso di migliorare la resa della diagnosi eziologica su liquor, che viene raccolto al momento del ricovero.

P198

MONITORAGGIO DI INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS (CMV) NEL PAZIENTE SOTTOPOSTO A TRAPIANTO DI INTESTINO

Nardini G.¹, Merighi A.², Nanni N.¹, Govi V.¹, Bartoletti A.¹, Calvo C.¹, Gennari W.¹, Tamassia G.¹, Pietrosepoli P.¹, Sabbatini A.M.T.¹, Pecorari M.¹.

¹Laboratorio di Virologia, Dipartimento Integrato dei Servizi e di Laboratorio, Policlinico, Modena.

²Gastroenterologia, Dipartimento Integrato di Medicina e Specialità Mediche, Policlinico, Modena.

Nei pazienti trapiantati di intestino/multiviscerale l'infezione da CMV rappresenta una delle complicanze infettivologiche maggiori risultando spesso responsabile di fenomeni di rigetto.

Scopo della ricerca: allo scopo di stabilire il rapporto tra infezione da CMV e rigetto d'organo, 6 pazienti sieropositivi per CMV, trapiantati di intestino presso il Centro Trapianti di Fegato e Multiviscerale del Policlinico di Modena, sono stati monitorati per riattivazione del virus.

Materiali e metodi: polimorfonucleati di sangue periferico sono stati analizzati per la presenza di CMV mediante ricerca dell'antigene pp65 (antigenemia). Genomi di CMV sono stati ricercati e quantificati, tramite Real Time PCR, in campioni di biopsie intestinali.

Risultati e discussione: su 20 episodi complessivi di rigetto, due, **a** e **b**, osservati in due diversi pazienti, presentavano marker positivi per CMV. Nel caso **a**, copie di CMV DNA erano presenti in elevato numero nella biopsia intestinale

mentre l'antigenemia risultava positiva per un basso numero di nuclei. Nell'episodio di rigetto **b** venivano riscontrati alti valori di antigenemia con basso numero di copie di CMV DNA nelle corrispondenti biopsie intestinali nei primi 6 giorni mentre nei 10 giorni successivi si osservava una inversione dei risultati: ad una antigenemia negativa corrispondevano valori elevati di virus nelle biopsie intestinali.

Una situazione virologica simile a quella associata al caso di rigetto **a** veniva osservata in due pazienti in assenza di manifestazione clinica.

Il fatto che gli stessi risultati virologici del caso di rigetto **a** si siano osservati anche in assenza di eventi clinici, suggerisce che la situazione virologica caratterizzata da: alto numero di copie di CMV DNA nelle biopsie e bassi o negativi valori di antigenemia non correla necessariamente con una situazione di rigetto diversamente da ciò che sembra avvenire quando vengano riscontrati alti valori di antigenemia come nel caso **b**.

In **conclusione**, ai fini del rigetto d'organo, i soli alti valori di CMV a livello intestinale appaiono meno predittivi rispetto ai soli alti valori di antigenemia essendo i primi, verosimilmente, conseguenti alla viremia da riattivazione di CMV a livello ematico.

P199

LA MICROSCOPIA ELETTRONICA QUALE UTILE SUPPORTO PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA VIRUS ENTERICI

Pinardi F., Arcangeletti M.C., De Conto F., Medici M.C., Valcavi P., Casula F., Ferraglia F., Motta F., Covan S., 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

Questo studio si è prefisso di mettere in luce i vantaggi derivanti da un uso mirato della microscopia elettronica nell'ambito della diagnosi di infezione/malattia da virus, in particolare da virus enterici.

Materiali e Metodi

Le indagini virologiche condotte presso l'Unità di Virologia (Sezione di Microbiologia) di Parma, si riferiscono a 3490 campioni di feci, analizzati in un arco di tempo di circa 5 anni, dal gennaio 1999 al gennaio 2004.

L'indagine elettromicroscopica è stata impiegata quale metodo rapido direttamente sugli estratti fecali che, parallelamente, sono stati inoculati in colture cellulari per mettere in evidenza la presenza di agente/i citopatogeno/i.

Gli estratti cellulari positivi (324) sono stati osservati al microscopio elettronico per l'identificazione definitiva del virus in causa.

Risultati

La microscopia elettronica applicata direttamente agli estratti fecali si è dimostrata uno strumento vantaggioso nello svelare, entro poche ore dall'arrivo del campione, la presenza di agenti virali, in particolare quelli difficilmente coltivabili, quali rotavirus, come anche la contemporanea presenza di due virus appartenenti a famiglie generi diversi.

D'altra parte, l'uso congiunto dell'esame colturale e la successiva identificazione dell'agente citopatogeno mediante microscopia elettronica, ha permesso di rivelare la presenza di virus, quali picornavirus, che possono sfuggire all'indagine eseguita sull'estratto fecale sia per la loro scarsa definizione strutturale che per concentrazione insufficiente.

Considerazioni conclusive

Sebbene l'esame elettromicroscopico non rappresenti sempre il metodo di scelta per la diagnosi di infezione da virus, la rapidità di ottenimento dei risultati e la possibilità di visualizzare l'agente (gli agenti) virale/i in causa, lo rendono uno strumento indispensabile in tutte quelle situazioni in cui la tempestività e la sinergia di interventi da parte del microbiologo e del clinico possono essere determinanti nel prevenire la diffusione di un'epidemia, o quando altri metodi convenzionali si mostrino inefficaci nello svelare l'agente virale in causa.

P200

CONFRONTO FRA PCR SEMIQUANTITATIVA E REAL-TIME PCR PER LA DETERMINAZIONE DI CMV-DNA SU PLASMA.

Gregori G., Milia M.G., Faraoni S., Simoncelli B., Di Garbo A., Pistono P.G., Bossi V., Martorana M., Allegramente L., Piro F.

Laboratorio di Virologia,
Ospedale di Malattie Infettive "Amedeo di Savoia", ASL 3, Torino.

Il CMV è causa di morbilità e mortalità nei soggetti HIV positivi.

La terapia HAART ha ridotto notevolmente l'incidenza della malattia da CMV e nei casi di malattia il decorso è più favorevole. Tuttavia nei soggetti in HAART, con conta di CD4+ >200, si segnalano casi di malattia da CMV nei primi mesi di terapia (CD4+ <200 prima della terapia HAART).

Il controllo della fase ematica dell'infezione, con i test dell'antigenemia pp65 e di PCR, permette la diagnosi e il monitoraggio della malattia da CMV.

La quantizzazione del DNA-CMV su plasma nei pazienti HIV positivi correla con la pp65, ha un buon valore predittivo positivo, ma è meno sensibile del DNA CMV da PBMC, che necessita la valutazione di un cut-off correlabile con il manifestarsi della patologia (Piro F. et al. 2000).

In questo studio si sono messi a confronto due diversi metodi d'indagine quantitativa di CMV DNA su plasma: la PCR all'Amplicor Monitor CMV (Roche Diagnostics), già in uso presso il nostro centro, con la Real time PCR (Amplimedical) di nuova introduzione, prendendo in considerazione parametri quali sensibilità e riproducibilità.

I risultati ottenuti sono stati anche comparati a test convenzionali quali la ricerca dell'antigene pp65 nei polimorfonucleati.

Si tratta di uno studio retrospettivo nel quale sono stati selezionati 40 campioni di plasma, di cui 23 risultati positivi all'Amplicor Monitor CMV, raccolti presso il nostro centro a partire da Gennaio fino a tutto Dicembre 2003.

La Real time PCR si è rivelata molto sensibile e ripetibile. I livelli viremici ottenuti (n° genomi/ml) con le due metodiche non sono comparabili; le viremie ottenute con la Real time PCR sono circa 9 volte maggiori rispetto a quelle ottenute con all'Amplicor Monitor CMV.

I risultati, in corso di elaborazione, saranno riportati in dettaglio nel poster.

P201

INFEZIONI DA EPSTEIN-BARR VIRUS ANALISI DELLA CASISTICA DI UN ANNO PRESSO L'OSPEDALE AMEDEO DI SAVOIA DI TORINO.

Pistono P.G., Martorana M., Allegramente L., Gregori G.,
Milia M.G., Faraoni S., Simoncelli B., Di Garbo A., Bossi V.,
Piro F.

*Laboratorio di Virologia e Microbiologia Ospedale Amedeo di
Savoia di Torino (ASL 3)*

Il virus di Epstein-Barr (EBV) infetta la maggior parte degli esseri umani in ogni parte del mondo.

L'Età della prima infezione varia a seconda delle condizioni socioeconomiche e dello stile di vita delle popolazioni; essa si manifesta o come Sindrome mononucleosica o in forma clinicamente inapparente. A seguito della prima infezione il soggetto rimane portatore del virus per tutta la vita con quadro sierologico caratteristico (positività IgG anti-VCA e anti-EBNA1) che può tuttavia mutare nel tempo in corso di altre infezioni virali o di depressione del sistema immunitario.

Obiettivo dello studio retrospettivo è ricavare informazioni utili ai fini diagnostici.

Materiali e metodi

E' stata studiata l'intera casistica dell'anno 2003 con 1685 campioni provenienti da pazienti con età da 0 a 86 anni. Sono stati ricercati (insieme o alternativamente) anticorpi eterofili, IgG ed IgM anti-VCA, EA ed EBNA1 con metodi Immunoenzimatici (Diasorin, Biotest) ed Immunoblot (Mikrogen-Arnika).

Risultati

110 campioni (7.3%) sono risultati sieronegativi per EBV; 162 (10.4%) mostravano un quadro anticorpale compatibile con Infezione Primaria da EBV; 1413 (83%) venivano classificati come compatibili con Infezione Pregressa o stato sierologico di Riattivazione.

Erano sieronegativi il 67% dei bambini da 0 a 2 anni, il 32% da 3 a 11, il 18% da 12 a 19 il 2-3% da 20 a 47; meno dell'1% dei casi oltre i 48 anni.

Il 94.6% dei pazienti con Infezione Primaria aveva età inferiore a 38 anni; il 4.7 % età compresa tra 38 e 47; lo 0.7% maggiore di 48 anni.

La stagionalità della Infezione Primaria da EBV variava significativamente nelle fasce di età considerate con una periodicità diversa a seconda delle differenti occasioni e modalità di contagio.

Concludendo riteniamo che un percorso diagnostico che tenga conto dei rilievi epidemiologici delle singole popolazioni possa sicuramente migliorare la propria efficacia riducendo il rapporto costi/benefici.

P202

PREVALENZA DI GENOTIPI DI PAPILLOMAVIRUS GENITALI NELL'AREA NOVARESE

Ravanini P., Nicosia A.M., Grossini E., Fortina G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Maggiore Novara

In questo studio si è cercato di valutare la distribuzione della positività e dei genotipi di Papillomavirus (HPV) genitali tra i campioni positivi di donne afferenti all'Ospedale Maggiore

di Novara.

Sono stati considerati 334 campioni di cytobrush cervico-vaginale, raccolti tra novembre 2001 e febbraio 2004. L'età delle pazienti è compresa tra i 18 e i 69 anni, con una media di 38,4 anni.

Per la ricerca del virus HPV è stato utilizzato il test HPV Screening COMBI KIT Special di Amplimedical, mentre per la tipizzazione dei campioni positivi è stato utilizzato il test INNO-LiPA HPV Genotyping di Innogenetics, secondo le indicazioni fornite dalle ditte produttrici.

I campioni positivi sono risultati 146 (43,7 % del totale), i campioni negativi sono risultati invece 166 (49,7 % del totale). 22 campioni hanno invece ripetutamente presentato inhibizioni dell'amplificazione.

La tipizzazione genotipica ha evidenziato una distribuzione molto varia dei genotipi, avendo rilevato ben 23 differenti genotipi virali.

Il genotipo più diffuso è risultato il 16, come già evidenziato in molti altri lavori, pur con una percentuale di positività nettamente inferiore a molti altri studi (20,2 % del totale dei positivi).

Genotipi molto diffusi sono risultati il 52 e il 31 (in entrambi i casi l'8,1 % dei positivi), il 66 (7,3 %), il 51 e il 53 (per entrambi il 6,5 %), il 18 e il 56 (per entrambi il 5,6 %). Meno diffusi sono risultati, nell'ordine, i genotipi 6, 58, 70, 39, 44, 33, 11, 35, 40, 42, 45, 54, 68/73, 34, e 43.

In particolare, solo il 35,5 % dei positivi è risultato ad "alto rischio", mentre il 36,3 % è da considerare a "rischio intermedio", e il 28,2 % a "basso rischio". Tra i genotipi a "basso rischio" il 66 e il 53 sono risultati decisamente più rappresentati rispetto ai genotipi 6 e 11.

Scomponendo il dato per fasce d'età risulta una significativa differenza tra la distribuzione delle positività nelle donne fino a 31 anni (il 62,5 % risulta positiva per uno o più tipi virali, contro un 34,1 % di negatività) in confronto alle donne con oltre 31 anni (solo il 37,0 % di positività contro il 55,3 % di negatività). Non sembra esserci invece una significativa differenza di distribuzione dei singoli genotipi nelle diverse fasce d'età considerate.

In conclusione possiamo affermare che la distribuzione dei genotipi virali di HPV risulta nella nostra casistica molto più varia rispetto a quanto riportato da altri recenti lavori.

P203

ANALISI SEMIQUANTITATIVA DELLE IgM ANTI-HBc CON DUE SISTEMI AUTOMATIZZATI IN CASI DI EPATITE B ACUTA E CRONICA

A. Rodella¹, A. Gussago¹, M. Faustini¹, C. Galli²

¹III Laboratorio Analisi, Spedali Civili, Brescia;

²Medical Marketing, Abbott Diagnostics, Roma

Una positività per IgM anti-HBc, oltre ad essere indicativa di una infezione acuta o recente da virus dell'epatite B (HBV), è spesso presente a bassi livelli, nelle epatiti croniche B, mentre non è rilevabile nei cosiddetti "portatori sani" di HBsAg.

La ricerca di anti-HBc-IgM a basso titolo con la tecnologia MEIA è ormai invalsa da un decennio; nel nostro lavoro abbiamo confrontato i risultati per anti-HBc-IgM ottenuti con questo metodo (AxSYM Core-M, Abbott Diagnostics) con quelli ottenuti con un nuovo sistema in chemiluminescenza (Abbott Architect Core-M).

Pazienti e metodi. Lo studio è stato condotto su campioni di pazienti ricoverati per epatite acuta B (18 campioni da 15 casi) o epatite cronica B (265 campioni da 75 casi) tra il 1999

e il 2003, e su un gruppo di 34 pazienti (43 campioni) con sospetta infezione acuta. Tutti i campioni sono stati analizzati per IgM anti-HBc con il nuovo metodo su Architect, che prevede una soglia di positività a un valore S/CO di 1 e una "zona grigia" tra 0,5 e 1. Sono stati confrontati sia i risultati qualitativi che i valori semiquantitativi (S/CO Architect e Index AxSYM).

Risultati. Tutti i campioni ottenuti dai pazienti con epatite acuta o sospetta epatite acuta B sono risultati positivi con entrambi i test per IgM anti-HBc, ma il segnale di positività era molto più intenso con Architect (media S/CO nei due gruppi: 21,0 e 25,2) che con AxSYM (media Index: 3,23 e 3,03).

Nelle epatiti croniche il 54,7% dei pazienti mostrava una positività IgM, quasi sempre a basso livello e concordante tra i due metodi, su almeno un prelievo. La correlazione tra Architect e AxSYM, per valori S/CO Architect <3,0, era elevata con regressione $Y = 1,08x + 0,113$.

Conclusioni: il nuovo test per IgM anti-HBc su piattaforma Architect ha mostrato delle caratteristiche simili al test MEIA su AxSYM per quanto concerne la capacità di identificare le IgM a basso titolo. Il "range" dinamico più ampio del test Architect può consentire una migliore valutazione delle infezioni acute.

P204

VALUTAZIONE PRELIMINARE DEGLI ANTICORPIANTI HTLV I-II IN PAZIENTI HIV-SIEROPOSITIVI ED IN POPOLAZIONE DI CONTROLLO

Rossi A, Bassani A, Berrone A, Pinese LA, Tamborini A, Canali E e Toniolo A.

*H. di Circolo e Università degli Studi dell' Insubria - VARESE
Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Citogenetica
(Direttore: Prof. Antonio Toniolo)*

I virus HTLV I-II sono stati i primi retrovirus riconosciuti associati a malattia nell'uomo; HTLV-I è l'agente eziologico di linfomi (ATL) nei pazienti adulti, di mielopatie e della paraparesi spastica tropicale (HAM/TSP).

La diagnosi microbiologica si basa sulla ricerca diretta di HTLV I-II e sulla diagnosi sierologica, con metodi ELISA ed immunoblot.

In questo studio preliminare sono stati rilevati gli anticorpi anti HTLV I/II utilizzando un metodo ELISA (Genelabs Diagnostics).

Sono stati studiati 61 sieri ottenuti da pazienti HIV-sieropositivi - confermati con immunoblot e con viremia - e 44 sieri come gruppo di controllo.

Sono state valutate statisticamente tutte le estinzioni ottenute nei sieri analizzati utilizzando metodi di statistica non parametrica; il valore di OD considerato come cut-off è stato >0.295, che rappresenta il 95° percentile dei valori rilevati nel gruppo di controllo.

Considerando tale cut-off ben 15 sieri su 61 totali appartenenti al gruppo dei pazienti HIV-sieropositivi contro 1 solo valore superiore al cut-off nel gruppo di controllo.

Per quanto riguarda i livelli di OD rilevati si evidenzia una differenza statisticamente significativa ($p = 0,0012$) tra i due gruppi di sieri studiati.

P205

INDAGINI SIEROLOGICHE E VALUTAZIONE DELLA VIREMIA CON METODI IMMUNOLOGICI E DI BIOLOGIA MOLECOLARE IN UNA POPOLAZIONE DI TRAPIANTATI RENALI CON INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS (HCMV).

Rossi A, Bassani A, Trabacchin C, Berrone A e Toniolo A.

*H. di Circolo e Università degli Studi dell' Insubria - VARESE
Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Citogenetica
(Direttore: Prof. Antonio Toniolo)*

Nei pazienti sottoposti a trapianto di rene l'infezione da Citomegalovirus [HCMV] è spesso causa di malattia e talora di mortalità post-trapianto. Scopo del presente lavoro è stato di studiare la risposta sierologica e le viremie - con metodo immunologico con la pp65 antigenemia e mediante biologia molecolare - utilizzando campioni di plasma raccolti in modo consecutivo da pazienti sottoposti a trapianto di rene ed in profilassi con Ganciclovir.

Gli anticorpi IgG ed IgM anti-HCMV sono stati studiati mediante ELISA (Diasorin); gli anticorpi IgM sono stati rivalutati mediante un secondo ELISA (Dade Behring). La determinazione della pp65 antigenemia è stata eseguita su leucociti mediante immunofluorescenza (Argene), mentre HCMV-DNA è stato studiato con PCR quantitativa (Roche) e i livelli di DNA borderline sono stati rivalutati mediante nested-PCR (Bioline). Sono stati studiati i campioni biologici di 31 pazienti per un totale di 220 plasmi, 220 pp65 antigenemie e 60 HCMV-DNA mediante PCR quantitativa.

Durante un periodo di circa 6-7 mesi, 10 pazienti durante o dopo profilassi con Ganciclovir sono andati incontro a malattia da HCMV, 4 nel primo mese post-trapianto, 4 dopo 2-6 mesi e 2 oltre i 6 mesi. La revisione dei dati ha evidenziato che con attento monitoraggio con pp65-antigenemia e HCMV-DNA si è ottenuta una risposta microbiologica positiva in 1-8 giorni. Il dato sierologico ha spesso mostrato, seppur tardivamente, un significativo aumento delle IgG ed un comportamento variabile delle IgM. Considerando i pazienti con dati virologici positivi il livello di IgG precedenti alla positivizzazione, ottenuti al momento del trapianto, erano spesso inferiori a 3,5 UI/mL; tuttavia particolare attenzione, nonostante i pochi casi, si sarebbe dovuta prestare a quei rari pazienti con IgG superiori a 8,5 - 10 UI/mL.

Visti i tempi di positivizzazione virologica ottenuti, una più stretta collaborazione tra Nefrologi, Infettivologi e Microbiologi potrebbe consentire di ottenere una risposta virologica in tempi ancora più vicini alla fase presintomatica delle riattivazioni da HCMV.

P206

ANALISI DI DATI SIEROLOGICI E DI BIOLOGIA MOLECOLARE IN INFEZIONI DA CITOMEGALOVIRUS (HCMV) IN TRE ANNI DI INDAGINI IN POPOLAZIONE NON SELEZIONATA, IN CASI MATERNO-FETALI ED IN POPOLAZIONI A RISCHIO.

Rossi A, Tamborini A, Baj A, Bassani A, Berrone A, Maccarini A, Pinese LA e Toniolo A.

*H. di Circolo e Università degli Studi dell' Insubria - VARESE
Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Citogenetica
(Direttore: Prof. Antonio Toniolo)*

Il citomegalovirus umano [HCMV] negli ospiti suscettibili può dare infezioni primarie, divenire latente e riattivarsi; può provocare malattie devastanti o accompagnarci come un ospite silente per tutta la vita.

Nel periodo da gennaio 2001 ad ottobre 2003 sono stati eseguiti 13677 test per ricerca di anticorpi anti-Citomegalovirus; sono stati utilizzati test ELISA per ricerca IgG ed IgM anti-HCMV [Diasorin], un secondo test ELISA per ricerca IgM [Dade-Behring], un test di affinità o "avidità" per IgG anti-CMV [Radim] e test virologici - pp65-antigenemia [Argene], nested-PCR [Bioline] e PCR quantitativa [Roche].

Su 13677 controlli per anticorpi anti-HCMV nel 5.9% dei campioni è stato necessario eseguire le suddette indagini sierologiche di approfondimento per poter inquadrare infezioni primarie, riattivazioni, infezioni croniche e/o cross-reazioni da altri agenti infettivi. In 45 casi - pari allo 0.42% - si è potuta evidenziare una infezione; tuttavia il totale dei casi con malattia clinicamente manifesta sono stati 10, lo 0.094%.

In circa 3 anni sono stati studiati 30 casi di infezione materna in corso di gravidanza; 15 avevano una chiara infezione primaria - sier conversione IgG, IgM positive, eventuale pp65-antigenemia, PCR positiva su sangue e/o urine e/o liquido amniotico. In 8 di questi 15 casi erano presenti nei feti e nei neonati dei chiari segni clinici di malattia citomegalica, pari al 53.3%; in 3 casi la gestante era anche HIV-coinfetta. Se consideriamo gli 8 casi di malattia da HCMV relativamente al totale delle infezioni, si sono verificati nel 17.7% delle infezioni con chiara diagnosi sierovirologica.

Per un corretta valutazione microbiologica è necessario integrare metodi sierologici - da utilizzare in modo estensivo su popolazioni non selezionate, o in corso di gravidanza o durante l'allattamento o per seguire neonati di madri a rischio - con metodi virologici come pp65 antigenemia e nested-PCR su sangue, urine, liquidi amniotici, ma anche liquor.

P207

RELAZIONE TRA LIVELLI DI VIREMIA E DI ANTIGENE "s" IN UNA POPOLAZIONE DI PAZIENTI HBsAg POSITIVI.

Rossi A, Rivetta E, Bassani A, Berrone A, Pinese LA, Canali E, Milano A, Rinaldi L e Toniolo A.

H. di Circolo e Università degli Studi dell'Insubria - VARESE
Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Citogenetica
(Direttore: Prof. Antonio Toniolo)

La diagnosi microbiologica di epatite B si basa sulla ricerca sierologica dell'antigene "s" [HBsAg], dell'antigene "e" [HBeAg]; l'utilizzo della determinazione della viremia [HBV-DNA] è indicata per valutare l'infettività e la prognosi in corso di epatite acuta e per stadare le epatiti croniche da HBV.

Scopo del presente lavoro è stato quello di studiare la relazione esistente tra HBsAg e viremia quantitativa, esaminando campioni clinici ottenuti da pazienti antigene "s" positivi. Per la determinazione di HBsAg è stato utilizzato un test ELISA con strip sensibilizzate con 4 monoclonali anti-HBs (Diasorin); per le viremie è stata utilizzata una metodica di PCR quantitativa (Roche). Sono stati studiati preliminarmente 166 campioni di siero ottenuti da 121 pazienti HBsAg-positivi; sui campioni di 28 pazienti, 10 con epatite B acuta - una fulminante - i restanti con epatite B cronica sono stati rideterminati sia HBsAg, che la viremia quantitativa entro un range da 10^2 - 10^9 copie/mL di HBV-DNA. La determi-

nazione di HBsAg è stata eseguita ripetutamente a diverse diluizioni dei sieri in esame; dall'analisi dei dati si è utilizzato come riferimento per la comparazione con la viremia il livello di estinzione [OD] ottenuto sui campioni diluiti 1:160. Livelli di OD compresi tra 1,5 e 3,0 spesso avevano viremie superiori a 10^5 copie/mL di HBV-DNA, mentre livelli di HBsAg superiori ad una OD di 3,0 avevano un range di viremie compreso tra 10^2 - 10^9 copie/mL.

Il cardine della diagnosi clinica di epatite B si basa indubbiamente su clinica, dati biochimici e determinazione di HBsAg e/o di HBeAg; tuttavia la positività per HBsAg sola non consente un corretto inquadramento della infettività e in assenza di dati clinici evidenti di infezione cronica una corretta valutazione di HBsAg e della viremia quantitativa potrebbero essere indicati con ragionevole rapidità anche ricorrendo a singole PCR quantitative.

P208

VALUTAZIONE DEL SISTEMA AUTOMATICO IMMULITE 2000 PER LA RICERCA DI ANTICORPI ANTI TOXOPLASMA E RUBELLA VIRUS.

Moroni A., Ruscello S., Biagi M., Capitani S., Della Bella E., Cavrini F., Storni E., Sambri V.

U.O. Microbiologia - Ospedale S.Orsola, Via Massarenti 9, 40138 Bologna

Le infezioni del complesso TORCH costituiscono ancor'oggi una importante causa di patologia trasmissibile in linea verticale da madre a feto durante la gravidanza e la sola possibilità di esclusione del rischio è la diagnosi sierologica di stato immune.

In questo studio sono state valutate le performance diagnostiche dei test per la ricerca di anticorpi di classe IgG ed IgM nei confronti di T. gondii e Rubella virus su Immulite 2000, un sistema ad accesso random, in automazione totale della DPC (Los Angeles, USA) distribuito da Medical Systems. La comparazione è stata condotta verso i sistemi ALISEI/Radim, BEPIII/DADE Behring, VIDAS/BioMerieux e con il sistema BEPIII/DADE Behring e VIDAS/BioMerieux per rosolia.

Sono stati saggiati 374 sieri per la ricerca di IgG ed IgM verso T.gondii e 253 campioni per la determinazione di IgG ed IgM verso Rubella virus.

La performance di Immulite 2000 rispetto agli altri sistemi è risultata nel complesso equivalente con una buona correlazione nei dati ottenuti.

Più precisamente i valori di concordanza con gli altri sistemi per la ricerca di IgG anti T.gondii sono stati: 100% per i negativi, 98.1% per i positivi.

Per IgM: 96.9% sui negativi e 93.5% sui positivi. Per la ricerca di IgG anti rosolia la concordanza è stata del 100% per i negativi e del 99.5% per i positivi, mentre per le IgM la concordanza è stata del 100% sui negativi.

L'Immulite 2000 si è dimostrato uno strumento tecnologicamente avanzato, di facile utilizzo ed impatto positivo nell'ambito del laboratorio.

In particolare, il software dello strumento offre all'operatore ampia possibilità di interagire con il sistema per una migliore gestione dei dati e del controllo di qualità.

P209

ABBOTT LCx HCV-RNA E DETERMINAZIONE DEL GENOTIPO HCV CON METODO LiPA: UTILIZZO DEI CAMPIONI ESTRATTI PER LCx

Valentini O.¹, Pulvirenti F.R.², Comastri G.²,
Domenighini D.¹, Milanese B.¹

Laboratorio di Patologia Clinica, Osp. di Gavardo (BS)¹
Abbott Molecular Diagnostics, Roma²

Obiettivo.

L'integrazione tra i processi analitici per la quantificazione viremica e per la genotipizzazione di HCV rappresenta un aspetto importante nella organizzazione del flusso di lavoro. Di recente è stato introdotto nel Laboratorio Clinico un nuovo dosaggio per la quantificazione di HCV-RNA, Abbott LCx HCV-RNA, dotato di un ampio intervallo di linearità (23–2.300.000 UI/mL) e basato su RT-PCR competitiva e curva di calibrazione esterna.

Il dosaggio amplifica una regione di 104 bp situata nella regione 5' UTR di HCV.

Al termine della reazione di RT-PCR i prodotti di amplificazione risultano marcati con gli apteni carbazolo e adamantano e non sono quindi direttamente genotipizzabili mediante "Line Probe Assay" (LiPA, Bayer), che richiede un amplificato biotinilato, rivelato, dopo ibridazione su striscia, mediante streptavidina-fosfatasi alcalina.

Abbiamo inteso allora verificare la compatibilità degli estratti ottenuti su colonne QIAmp secondo quanto previsto dalla metodica LCx con il test LiPA (Bayer), previa retrotrascrizione e amplificazione della regione 5'UTR, mediante il kit "HCV RNA screening" della Nuclear Laser Medicine.

In particolare vi era da verificare l'eventuale interferenza dello standard quantitativo interno (105 bp) aggiunto all'inizio della fase di estrazione e perciò presente nell'estratto, per la possibilità che tale competitore venisse parimenti amplificato attraverso gli inneschi biotinilati e ibridasse poi sulla striscia LiPA.

Metodi.

Dei 120 ul di eluato di RNA purificato, 50 ul sono stati impiegati per la determinazione della carica virale mediante LCx e 30 ul sono stati congelati e poi utilizzati per la retrotrascrizione e la successiva amplificazione mediante "HCV-RNA screening" della NLM. Gli amplificati sono stati poi utilizzati per l'ibridazione con metodo LiPA.

Risultati.

La procedura di genotipizzazione con LiPA da estratto LCx è stata verificata finora su 60 campioni, sui quali sono stati ottenuti tutti i quadri di ibridazione più frequenti, corrispondenti ai genotipi 1a, 1b, 2a/2c, 2, 3a, 4, 4c/4d. In tutti i campioni saggiati il competitore interno non dà luogo ad alcuna banda di ibridazione, e del resto nessuna banda di ibridazione si ottiene sottoponendo il competitore da solo (in assenza di HCV) a RT-PCR con inneschi NLM e poi a test LiPA.

Conclusioni.

Gli estratti ottenuti in corso di determinazione quantitativa di HCV-RNA con metodo Abbott LCx possono, previa retrotrascrizione e amplificazione con un kit commerciale per HCV-RNA (NLM), essere utilizzati per la genotipizzazione con la ormai diffusissima metodica LiPA (Bayer). Ciò consente di ottimizzare risorse e tempi di esecuzione per chi utilizzi la metodica LCx per la quantificazione e la metodica LiPA per la genotipizzazione di HCV.

P210

VACCINAZIONE ANTIINFLUENZALE 2003/04 NEI SERVIZI DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO DELL'AO POLICLINICO DI MODENA

Vecchi E.⁽¹⁾, Peccone L.F.⁽¹⁾, Marchegiano P.⁽²⁾

⁽¹⁾Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia,
Via Campi, 287, 41100 Modena,

⁽²⁾Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena,
Via del Pozzo 71, 4100 Modena

La campagna vaccinale antinfluenzale 2003-2004 comprende tra gli aventi diritto gratuitamente anche tutti coloro che operano in strutture sanitarie (sia personale sanitario che amministrativo). Quest'anno è stata incentivata la vaccinazione soprattutto per evitare la sintomatologia per alcuni caratteri sovrapponibili tra SARS e influenza, che si mascherino casi di SARS rendendo difficoltosa la diagnosi differenziale. Nell'Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena, la vaccinazione è stata messa a disposizione di tutto il personale come da Circolare Ministeriale.

La fonte dei dati sono le schede vaccinali compilate all'atto della vaccinazione dal medico-vaccinatore.

Dei 2.859 dipendenti dell'AO di Modena ne sono stati vaccinati 596 (20.8%) di cui 230 (38.6%) infermieri, 197 (33.1%) laureati, 93 (15.6%) tecnici e 76 (12.8%) amministrativi. La categoria che proporzionalmente è stata più vaccinata è quella dei laureati (35.2% sul totale dei laureati), poi gli amministrativi (22%), gli infermieri (19.2%) e da ultimi il personale tecnico (12.3%). Nei servizi di microbiologia e virologia, tossicologia e farmacologia, immunotrasfusionale e laboratorio centralizzato sono stati vaccinati il 60.5% dei laureati in servizio, 40% degli infermieri, 28.9% dei tecnici, e nessun amministrativo. In generale, il personale dei servizi considerati rappresenta il 4.8% del totale del personale aziendale e di questi ne sono stati vaccinati il 35.5% e, in particolare, il 36.4% del personale del servizio di microbiologia e virologia, il 30% del personale del servizio di tossicologia e farmacologia, il 45.3% del personale del laboratorio centralizzato e il 26.4% del servizio immunotrasfusionale.

In conclusione, la copertura vaccinale antinfluenzale nei servizi di laboratorio dell'Azienda Ospedaliera Policlinico di Modena risulta complessivamente bassa (35.5%). Il personale del laboratorio centralizzato è stato quello che si è vaccinato maggiormente (45.3%). La categoria professionale che maggiormente si è vaccinata nei servizi considerati è quella del personale laureato (60.5%).

P211

OSSERVAZIONI SULL'USO DI PRODOTTI PER L'IGIENE INTIMA FEMMINILE

Audisio G.; D'Errico L.; Pasino C.; Orsogiacone G.

ASL 5 Laboratorio Analisi Collegno (TO)

Una indagine DOXA realizzata nel mese di aprile 2001 evidenziava che il 73% delle donne intervistate dichiarava di provvedere alla propria igiene intima in media più di una volta al giorno. Confrontando i dati anamnestici e i risultati batteriologici eseguiti sugli esami vaginali delle pazienti afferenti al nostro Laboratorio analisi, si evidenzia che il 64% degli esami di 1992 pazienti che si era dichiarata sintomo-

matica era negativo. Per valutare se ci fossero eventuali correlazioni con l'utilizzo di prodotti per l'igiene intima è stato richiesto di specificare il tipo di detergente usato.

Il 69,4% delle pazienti utilizza un prodotto comprato al supermercato, il 12,95% sapone di marsiglia o acqua, il 16,52% un prodotto acquistato in farmacia, l'1% un prodotto di erboristeria e lo 0.10% un prodotto omeopatico. Tabelle analitiche riportano le osservazioni relative alla sintomatologia (prurito, bruciore, disuria) correlate al tipo di prodotto usato: si dichiarano più sintomatiche le pazienti che usano prodotti di farmacia. Vengono riportate inoltre le osservazioni sugli isolati: candida (maggiore riscontrata nelle utilizzatrici del sapone di marsiglia), *Gardereella v.* (p. farmacia), opportunisti (p. farmacia). Infine si riportano le correlazioni tra l'utilizzo dei vari tipi di prodotti e la "formazione culturale" delle pazienti, prendendo come indici la scolarità, l'età delle pazienti e il tipo di assorbente usato.

P212

VALUTAZIONE DI ATTIVITA' ED EFFICACIA DI UN SAPONE ANTISETTICO SPECIFICAMENTE STUDIATO PER L'USO IN TERAPIA INTENSIVA.

Besutti V., Barbazza R., Prenzani D., Grisi G., Sorio O.

Servizio di Farmacia O.C.M., Azienda Ospedaliera di Verona

Scopi

Il lavaggio antisettico delle mani è un punto critico nel controllo delle infezioni nosocomiali. E' noto che i detergenti a base alcolica sono gli agenti antisettici più efficaci nel ridurre la flora batterica della cute.

L'obiettivo dello studio è di valutare l'attività e l'efficacia di un sapone antisettico formulato per l'uso nosocomiale ed allestito all'interno di un ospedale.

Lo studio dell'attività indica verso quale categoria di microrganismi agisce il disinfettante e ne determina il tempo di contatto.

L'efficacia valuta la rimozione della flora microbica in termini di riduzione logaritmica della carica.

Metodologia

I test sono stati eseguiti mediante filtrazione su membrana (0,45 µm), dopo relativa convalida. I batteri esaminati sono stati *P. aeruginosa*, *S. aureus* (secondo Farmacopea Ufficiale XI edizione) e *S. epidermidis* quale *Stafilococco* coagulasi negativo che colonizza la cute. Il prodotto è stato testato dopo 1 e 5 minuti di contatto con i microrganismi alla concentrazione iniziale di 10⁸ UFC/ml.

Risultati

Il sapone antisettico agisce su tutti i batteri: dopo 1 minuto di contatto, il prodotto ha ridotto la carica microbica dei due ceppi di *Stafilococchi* fino a 10² UFC/ml e dopo 5 minuti fino a 1 UFC/ml. I batteri gram negativi sono stati abbattuti completamente dopo essere stati per 1 minuto a contatto col sapone.

Considerazioni conclusive

Il prodotto in esame si può considerare attivo ed efficace verso i microrganismi testati, avendo ridotto la carica di almeno 5 log.

Il lavaggio della cute con sapone antisettico può migliorare l'igiene delle mani e quindi ridurre la trasmissione di microrganismi patogeni a pazienti ed operatori sanitari impegnati nelle terapie intensive.

La scelta di introdurre nei protocolli della disinfezione un detergente a base alcolica, in associazione con altri antimicrobici di provata efficacia, potrebbe contrastare l'attuale problema emergente della resistenza alla terapia antibiotica.

P213

ONTOGENESI DELLA FLORA INTESTINALE NEI PRIMI SEI MESI DI VITA: EVIDENZE DALLO STUDIO ALLERGYFLORA

Bonanno C.L., Avaltroni N., Benedetti C., Coccillillo G.C., Cristaldi A., Lauri S., Longo R., Mesiti A., Panetta V., Spanò A., Tripodi S., Matricardi P.M.

Servizio di Microbiologia Ospedale "S. Pertini" ed *Asthma & Allergy Research Unit Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Introduzione.

L'igiene durante il parto e nella vita quotidiana condiziona la composizione della normale microflora intestinale. Poiché nel topo la microflora intestinale sostiene la tolleranza ad antigeni orali, le trasformazioni della flora intestinale indotte dall'igiene potrebbero contribuire all'epidemia di allergie nei Paesi sviluppati.

Scopo.

Il Progetto europeo ALLERGYFLORA valuta la possibile relazione tra la colonizzazione batterica intestinale nel primo anno di vita e lo sviluppo di allergie in 300 bambini Italiani, Svedesi ed Inglesi. Riportiamo l'analisi preliminare della microflora intestinale di 81 bambini italiani nel primo semestre di vita.

Materiali e metodi.

Abbiamo studiato la flora intestinale aerobia o facoltativamente anaerobia di 81 bambini a 3 giorni dalla nascita, prelevata con un tampone rettale. La flora aerobia ed anaerobia è stata valutata in campioni fecali raccolti in anaerobiosi ad 1, 2, 4, 8 settimane ed a 6 e 12 mesi, conservati a +4°C e seminati su terreni standard selettivi e non selettivi entro 24h. Sono stati coltivati ed identificati (API 20E e Rapid Id32A, Bio-Mérieux) Enterobatteri, Stafilococchi, Enterococchi, Lattobacilli, Bifidobatteri, Clostridi, Bacteroides e Lieviti.

Risultati.

Come atteso, la flora aerobia si è ridotta e quella anaerobia incrementata nel primo mese di vita.

Tra gli aerobi, aumenta progressivamente la presenza delle Enterobatteriacee [79% a 7 giorni, 100% a 6 mesi] tra cui *E. Coli* [48% a 7 giorni, 86% a 6 mesi], dello *Stafilococcus aureus* [18% a 7 giorni, 49% a 6 mesi] e degli Enterococchi [82% a 7 giorni, 100% a 6 mesi], si riducono invece gli *Stafilococchi* coagulasi negativi [96% a 7 giorni, 55% a 6 mesi].

Tra gli anaerobi, aumentano progressivamente Clostridi, Lattobacilli e Bifidobatteri. Scarsa la frequenza di Bacteroides [12% a 7 giorni, 27% a 6 mesi].

Conclusioni.

L'ontogenesi della flora microbica in bambini italiani è caratterizzata da una ritardata acquisizione di Enterobatteriacee e da una prolungata presenza di *Staphylococcus aureus*.

Ciò dimostra differenze rispetto a quanto avviene in bambini nati e cresciuti in Paesi in via di sviluppo, dove l'*E. Coli* compare invariabilmente nella prima settimana di vita.

Le fasi successive dello studio permetteranno di verificare se tali differenze determinano un maggior rischio di allergie tra i nostri bambini.

P214

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI HPV MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENICO E CORRELAZIONE CON IL QUADRO CITOLOGICO IN DONNE SOTTOPOSTE A SCREENING PER LA PREVENZIONE DEL TUMORE CERVICALE

Cappiello G¹, Longo R.¹, Abbate I.^{1,2}, Visca M.¹, Pontani G.¹, Manni N.¹, Capobianchi M.R.², Spanò A.¹.

¹Ospedale "S.Pertini" e ²INMI "L.Spallanzani", Roma

La classificazione degli HPV su base epidemiologica rispetto alle potenzialità oncogene è soggetta a continuo aggiornamento. Alcuni tipi di HPV non sono rilevabili con le tecniche di ibridazione comunemente usate.

Scopo dello studio è stato quello di eseguire, su donne sottoposte a screening per la prevenzione tumorale, la tipizzazione molecolare dell'HPV mediante sequenziamento e di correlare le positività con la citologia cervicale.

Sono state arruolate 130 donne (età mediana 35.5, range 17-62). I tamponi cervicali sono stati sottoposti ad amplificazione genica per la regione L1 di HPV. I campioni positivi sono stati tipizzati mediante sequenziamento diretto. E' stato eseguito parallelamente un PAP-test.

Il 28.4% delle donne risultava positivo all'HPV e di queste il 67.5% albergava genotipi ad alto rischio (16-18-31-33-39-52-56-53-58-59-MM9) vs il 24.3% con tipi a basso rischio (6-54-62-70-84). E' stata evidenziata una coinfezione (16+56); non è stato possibile tipizzare due campioni. I genotipi (MM9-62-84) non sarebbero stati rilevati con i più comuni kit commerciali che usano l'ibridazione. Il 72% delle donne con tipi ad alto rischio presentava lesioni di basso ed alto grado, mentre solo il 44% delle donne con tipi a basso rischio presentava lesioni, e solo di basso grado.

La prevalenza di HPV e le frequenze dei vari tipi da noi riscontrate è in linea con i dati di letteratura europea. Il sequenziamento evidenzia genotipi (MM9-62-84) non rilevabili con metodiche di ibridazione. Per quanto riguarda le possibili associazioni tra tipi di HPV e grado di alterazione citologica i tipi ad alto rischio si riscontravano sia nelle lesioni di basso grado sia in quelle di alto grado, mentre quelli a basso rischio sono sempre associati a lesioni di basso grado o citologia normale. Un follow-up viro-citologico potrà fornire indicazioni circa la probabilità e la velocità di progressione delle lesioni nelle persone infette dai diversi tipi di HPV.

P215

PIANO ORGANIZZATIVO DI CONTROLLO MICROBIOLOGICO IN UN LABORATORIO DI PATOLOGIA CLINICA ALLA LUCE DELL'APPLICAZIONE DELLA LEGGE 626/94.

Cocco M.P.; Migliozi A.

Nell'ambito della gestione di un sistema di qualità in ambiente sanitario, notevole rilevanza riveste una corretta applicazione delle normative previste in materia di prevenzione (D.L.626/94).

Obiettivo del seguente lavoro è stato quello di implementare un programma utile ad affrontare i principali problemi legati al Controllo Microbiologico Ambientale e, specie quando poi l'ambito di gestione sia rappresentato da un Laboratorio di

Analisi Microbiologiche, area notoriamente a rischio biologico particolarmente elevato.

Nel seguente lavoro il controllo microbiologico ambientale è eseguito a due livelli:

*CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELLE SUPERFICI

*CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELL'ARIA

Per le superfici di contatto si sono utilizzate le piastrine "contact-plate" di superficie pari a 24 cmq e per la raccolta dei campioni di aria si è impiegato il campionatore S.A.S.

Dopo che gli interventi di sanificazione previsti sono stati attuati sulle superfici e la ventilazione è stata regolata in modo che sono stati possibili 5 ricambi di aria/h, il controllo si è così presentato:

il numero di microrganismi espresso in UFC presenti in 1 mc di aria è stato:

MESOFILI	376
MUFFE	confluenti
COLIFORMI	0
STAFILOCOCCI	24

Il numero di microrganismi espresso in UFC presenti in 24 cmq di superficie è stato:

PARETI	
MESOFILI	10
MUFFE	0
COLIFORMI	0
STAFILOCOCCI	1

PAVIMENTO	
MESOFILI	confluenti
MUFFE	confluenti
COLIFORMI	3
STAFILOCOCCI	3

SUPERFICI DI LAVORO

MESOFILI	10
MUFFE	3
COLIFORMI	2
STAFILOCOCCI	1

Conclusioni: l'analisi dei risultati dimostra che i limiti di accettabilità sono superati per quanto riguarda i MESOFILI TOTALI e le MUFFE sul pavimento e i livelli di MUFFE nell'aria del Laboratorio di Patologia Clinica sono eccessivi.

P216

CQ E QUALITA' DEI CONTROLLI: GRAMMATICA E PRATICA

De Angeli A., Vagni A., Roveda A., Massardi R., Montanelli A.

Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda

"Ospedale Maggiore di Crema" via Macallè 13, 26013 Crema

Obiettivo: Valutazione delle performance diagnostiche/analitiche di una procedura per la ricerca delle IgM antitoxoplasma e del ruolo dei dati presentati nella tabella riassuntiva della VEQ di sierologia della Regione Lombardia.

Materiali e Metodi: Presso il nostro laboratorio la ricerca delle IgM antitoxoplasma viene effettuata con una procedura a due step che prevede al primo step l'impiego di una metodica in completa automazione e ad elevata sensibilità (Toxo IgM, AXSYM System, Abbot) e l'esecuzione di un successivo step di conferma, a favore dei campioni risultati positivi, con procedura semiautomatica ad elevata specificità (Vidas Toxo IgM, Biomerieux).

Risultati: Dal gennaio al dicembre 2003 sono stati processati 5011 campioni: al primo step di indagine 46 sono risultati positivi, mentre al secondo step si sono riconfermati tali solo in numero di 12.

Conclusioni: Dalla tabella dei dati della VEQ regionale emerge che il metodo da noi utilizzato come screening e quello utilizzato come conferma hanno fornito dati concordi nel 100% de casi. La nostra esperienza invece ci offre informazioni diverse: i due metodi risultano esprimere performance analitiche non sovrapponibili. E' peraltro giusto che il metodo di screening sia più sensibile e meno specifico e quindi rilevi anche gli anticorpi aspecifici.

I 12 campioni positivi anche al II° step sono dei "veri positivi", il metodo di conferma è basato su una metodica a cattura che rileva solo ed esclusivamente le IgM rivolte verso il *Toxoplasma gondii*.

I 34 campioni risultati negativi al test di conferma, poiché hanno delle IgM di tipo aspecifico, non sono clinicamente rilevanti e pertanto è corretto considerarli "falsi positivi" sul piano analitico e negativi sul piano clinico, in quanto diversamente determinerebbero ingiustificato allarme nelle pazienti con alti costi umani (stress) e sanitari (controlli e terapie non necessarie).

I dati della VEQ svolgono un importante ruolo nel monitoraggio dell'accuratezza analitica, ma non possono rivestire il ruolo di un riferimento assoluto per l'adozione di procedure diagnostiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Controlli di sierologia VEQ regione Lombardia

P217

SIEROLOGIA DELLE MALATTIE INFETTIVE: UTILIZZO DI UN ANALIZZATORE AUTOMATICO MULTIPARAMETRICO

Bonamore R.*, Garlaschi M.C.*, Ronchi M.A.*,
Ramponi C.*, De Michele G.*, Righi F.*, Scarazatti E.*

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

È stato messo a punto, di recente, dall'Azienda "Diesse Diagnostica Senese" un sistema automatizzato multiparametrico (CHORUS) che sfrutta contemporaneamente tecnologie diverse (metodo immunoenzimatico EIA e Fissazione del Complemento FC). Inoltre utilizza un dispositivo (strip) multi-cuvetta e mono-test dedicato con reattivi pronti all'uso, **Scopo.** L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare se la strumentazione potesse essere utilizzata per piccole e medie routine, caratterizzate da richieste: **A-** rivolte contemporaneamente verso molti parametri infettivi (virus influenzali, parainfluenzali, EBV, virus pneumotropi, neurotropi, gastrici etc.) e **B-** con carattere d'urgenza, così da fornire una diagnosi sierologica nel più breve tempo possibile.

Materiali e Metodi. Abbiamo valutato 73 campioni di siero da altrettanti pazienti pediatrici con segni di infezione clinicamente ascrivibile ad Epstein Barr Virus e 42 campioni di siero da altrettanti pazienti pediatrici con richiesta di Virus respiratori (Influenza A e/o Influenza B e/o Adenovirus e/o Legionella). Abbiamo confrontato il nuovo sistema, con il metodo utilizzato routinariamente nel nostro laboratorio (Metodo EIA: Ditta Bouty, Fissazione del Complemento: Seramat Diesse Diagnostica Senese).

Risultati. La ricerca degli anticorpi anti VCA IgG e IgM nei 73 sieri valutati è risultata: in 64 casi concordante sia per IgG che per IgM (87.7%) e in 9 casi discordante (12.3%); di questi ultimi, 3 casi discordavano sia per IgG che per IgM, 5 casi discordavano solo per IgG e 1 caso solo per IgM. Per quanto riguarda la FC, dei 43 campioni esaminati 34 erano concordanti (30 negativi e 4 positivi) (79.1%), 3 casi discordanti (7.0%) e 6 casi dubbi (13.9%).

Considerazioni e Conclusioni. Tale strumentazione, sia per le caratteristiche intrinseche dello strumento (il dispositivo mono-test, pronto all'uso, contiene tutti i reagenti necessari per l'esecuzione del test) che per i buoni risultati ottenuti, anche se preliminari, ci permette di affermare che bene si inserisce nella gestione e nella organizzazione del laboratorio stesso, soprattutto per soddisfare le richieste urgenti multiparametriche di piccole serie.

P218

CONTROLLO DI PROCESSO NEL LAB. DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER LO SCREENING DELLE UNITA' DI SANGUE

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

Dip. A - Medicina Trasfusionale, AO OIRM S. Anna - Torino.

Introduzione: Lo scopo di questo studio è quello di valutare continuamente nel tempo il processo della tecnologia NAT (Nucleic Acid Testing) in uso nel nostro laboratorio. Lo screening NAT fu implementato nel nostro laboratorio a partire dal 4 Novembre 2001 con tecnologia HIV-1/HCV Chiron Procleix. Fino al 31 Dicembre 2003 furono testate 190000 donazioni provenienti da 50000 donatori per anno, di cui 7000 nuovi donatori.

Metodi: Regularmente sono stati monitorati la forza lavoro, l'ambiente, i materiali e i metodi, secondo il diagramma di Isikawa. Ambiente: monitoraggio della sterilità/contaminazione di strumentazione, arredi, guanti a calzari degli operatori mediante tamponi sterili. I tamponi sono immersi in plasma negativo contenuto in provette di campionamento e quindi sottoposti a procedura analitica. Strumenti: Ogni 4 mesi viene seguito un CQC (Continuous Quality Control) mediante test gravimetrico sugli strumenti: Tecan pool, LeaderHC+, TCS, pipette, e un test colorimetrico per i Vortex. Materiali: Prima dell'uso in routine dei reagenti con numero di lotto diverso da quello impiegato vengono eseguiti test di prova con relative elaborazioni statistiche. Metodi: esecuzione di CQI, mediante l'introduzione in ogni corsa analitica del "run control" RC (STD ISS HCV-RNA 40 UI/ml) e adesione a programmi di VEQ.

Risultati: Non è stata rilevata alcuna contaminazione. Il CQC ha dimostrato un'elevata precisione (CV<1.5%) e buona accuratezza (1-3%) per tutta la strumentazione. Il CV dei valori giornalieri e mensili del RC sono <10% con una ds=0.7.

Conclusioni: Il protocollo impiegato nel nostro laboratorio è estremamente utile per tenere sotto controllo il processo in ogni step ed intervenire in tempo reale sugli errori casuali/sistematici.

P219

COME TOGLIERE IL MICROBIOLOGO CLINICO DALLA LISTA DELLE SPECIE IN PERICOLO DI ESTINZIONE

Giocoli G.¹, Pauri P.^{1,2}, Ricci L.^{1,3}, Tranquillo M.^{1,4}, Urbano P.^{1,5}

¹GdL EBM AMCLI, Milano;

²UO Virologia, AO Umberto I, Ancona;

³UO Microbiologia e Virologia, AO SMN, Reggio Emilia;

⁴Ist Zooprofil Sper Lombardia-Emilia, Brescia;

⁵Università degli Studi, Dip. Sanità Pubblica, Sez. Microbiologia, Firenze.

L'*hi-tech* delle moderne procedure diagnostiche non è garanzia di accuratezza dei risultati e lo studio dell'efficacia dei test è dovere primario del microbiologo clinico.

Esiste tuttavia il problema della sua formazione e della difesa della sua identità professionale negli attuali processi di consolidamento delle strutture sanitarie.

Inoltre, è indispensabile che le conoscenze acquisite nella comunità microbiologica siano accessibili e comprensibili a chi ne utilizza il lavoro, a chi lo amministra e a chi lo governa.

Noi riteniamo che anche il trasferimento delle conoscenze sia un compito professionale del microbiologo clinico, finalizzato a colmare il solco tra l'evidenza scientifica e la sua applicazione all'assistenza sanitaria.

Metodi. Durante l'anno 2003 uno di noi (GG) ha effettuato una ricerca su articoli e rassegne sull'*evidence-based teaching* ed ha seguito il dibattito "*Evidence for evidence-based practice*" nella lista di discussione *Evidence-Based Health Care (EBHC-NHS)*.

Risultati. In ciascuna comunità scientifica l'*Educazione continua* (ECM) e lo *Sviluppo professionale* (SP) ruotano in una ristretta orbita che ha per asse il binomio docente-discente (1).

Nella *Knowledge translation* (KT) le due iniziative confluiscono in un processo più ampio, finalizzato al miglioramento degli *outcomes* sanitari mediante la diffusione di conoscenze basate su prove scientifiche (1).

Il *Knowledge brokering* (KB) può essere considerato lo strumento di attuazione della KT. Il KB procede ben oltre il trasferimento di nozioni da una sorgente a un recettore, perché aiuta a costruire legami e network per rendere condivisibili idee e risultati e stimolare nuove iniziative.

Il *broker* (lett. *mediatore*) identifica e mette in contatto persone interessate in un argomento e in grado di aiutarsi a vicenda per trovare soluzioni basate sull'evidenza scientifica.

Conclusioni. Non è un *knowledge broker* il microbiologo che aggiorna colleghi e amministratori sull'evolversi delle biotecnologie, perché costui non fa che trasferire conoscenza.

"*The broker role is about bringing people together*": lo diviene dunque "se organizza riunioni con i suoi colleghi e i responsabili della politica sanitaria, aiutandoli a sviluppare progetti basati sull'evidenza scientifica" (2).

BIBLIOGRAFIA

1. The case for knowledge translation: shortening the journey from evidence to effect. Dave Davis, et al. *BMJ* 2003;327:33-5
2. The Theory and Practice of Knowledge Brokering. Canadian Health Service Research Foundation, 2003 (www.chrsf.ca).

P220

LA VALUTAZIONE IGIENICO-AMBIENTALE DELLE SALE OPERATORIE: ESPERIENZA IN UN POLICLINICO UNIVERSITARIO DELLA SARDEGNA.

Meloni P., Lobina M., Muggianu R., Ferrando M. L., Schintu M., Contu A.

Dipartimento di Sanità Pubblica - Sezione Igiene - Laboratorio Igiene Ambientale - Università degli Studi di Cagliari, Via Porcell 4, 09100 Cagliari.

Obiettivi - Sono stati presi in esame i risultati analitici ottenuti dai monitoraggi microbiologico-ambientali nelle sale operatorie del Policlinico Universitario di Cagliari effettuati nell'arco di tempo compreso tra Dicembre 2003 - Marzo 2004 nell'ambito di un progetto d'indagine che avrà termine nel Settembre 2005.

Il blocco operatorio è costituito da tre sale, dotate di un sistema di ventilazione laminare a flusso verticale e relative sale risveglio pazienti. L'obiettivo dello studio è quello della valutazione dell'efficacia dell'impianto VCCC e l'efficacia dei protocolli di sanificazione. Inoltre sono state esaminate le condizioni microclimatiche che caratterizzano l'*indoor*, per garantire il rispetto di un ambiente "confort" per gli operatori e pazienti durante l'attività.

Materiali e metodi - Tale indagine ha quantificato la carica batterica mesofila e micetica totale nelle superfici di lavoro e nell'aria sui seguenti siti: aria ambiente in sala operatoria e sala risveglio; aria immessa dall'impianto di condizionamento (in uscita dai filtri assoluti). L'acqua sanitaria è stata analizzata secondo il D. Lgs. 31/01. I rilievi sono stati effettuati in condizioni di AT-REST (sala vuota, non operativa) in OPERATIONAL e fine attività. Il monitoraggio del microclima delle sale operatorie è stato eseguito con apposita centralina, che fornisce, ad intervalli di tempo prestabiliti, i valori di base ed elaborati per indici.

Risultati - Una preliminare elaborazione dei dati relativi al controllo della carica batterica e micetica e del microclima, è stata confrontata con i limiti indicati dalle "linee guida ISPESL per la sicurezza e l'igiene ambientale dei reparti operatori" e con altri parametri di riferimento riportati in letteratura. I risultati finora ottenuti non si discostano dai limiti consigliati. **Conclusioni** - Il monitoraggio microbiologico ambientale verrà confrontato con i dati epidemiologici sulle infezioni nosocomiali fornite dal CIO del policlinico, in quanto da solo non fornisce un panorama completo della situazione igienico ambientale associata con l'insorgenza di eventuali infezioni.

P221

OTTIMIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI SIEROLOGIA IN UN SETTORE DEDICATO.

Ernesto M., Parenti P., Grassi V., Lucaccini M., Fantoni L., Lagostina G.

ASL I Massa - Carrara

U.O. C. di Medicina di Laboratorio

"Settore di Sierologia e Immunometria"

Riassunto e conclusioni

Il presente lavoro mette in evidenza come, attraverso una scelta organizzativa appropriata, si possa automatizzare un

settore di Sierologia, rendendolo più produttivo e aumentando il livello qualitativo delle prestazioni senza ricorrere ad un maggior impiego di risorse economiche e di personale. La flessibilità della strumentazione utilizzata, ALISEI BY RADIM, oltre ad avere eliminato gli aspetti negativi delle grandi serie nella Immunoenzimatica delle micropiastre, attraverso la ottimizzazione dei tempi di esecuzione, lavaggi e letture ha consentito l'automazione anche delle piccole serie, da sempre considerate in Sierologia, uno degli elementi di forte criticità, perché realizzate di solito con procedure manuali.

P222

ANALISI MICROBIOLOGICHE NELL'INSALATA PRONTA PER IL CONSUMO

Caldarelli-Stefano R., Menin E*, Bernasconi E*, Verona L*, Molina V.

Laboratorio Analisi CAM, Monza (MI),

sez. Diagnostica Molecolare,

* sez. Microbiologia Clinica e Microbiologia degli Alimenti.

L'utilizzo delle insalate già tagliate, lavate e pronte all'uso sta sempre più diffondendo nell'uso domestico, nei ristoranti e nelle mense. Indubbiamente questi vegetali giocano un ruolo importante nella dieta umana, ma la possibile contaminazione microbiologica può rappresentare un rischio per la salute dell'uomo. Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la qualità microbiologica delle insalate fresche vendute nei comuni supermercati delle nostre città.

Per ogni campione è stata valutata la presenza di *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophyla*, *Escherichia coli*. E' stata ricercata inoltre la presenza di *Toxoplasma gondii* e Norovirus tramite metodiche di biologia molecolare.

E. coli è stata isolata con valori superiori a 10^2 CFU/g nella maggior parte dei campioni.

L'elevata percentuale dei campioni positivi per *E. coli* suggerisce come queste verdure possano risultare un potenziale veicolo di microrganismi patogeni e di contaminazione crociata. Si evidenzia pertanto la necessità di implementare buone pratiche igieniche dalle aziende di produzione alla tavola.

P223

COME I MICROBIOLOGI CLINICI DELLE MARCHE CERCANO DI TOGLIERSI DALLA LISTA DELLE SPECIE IN PERICOLO DI ESTINZIONE

Pauri P.^{1,2}, Acetoso M.³, Agostinelli C.³, Cipriani S.³, Delprete E.³, Frontini P.³, Manso E.³, Manzin A.³, Marianii A.³, Migali A.³, Orlandi G.³, Politi A.³, Rossi S.³, Santacroce F.³, Maffei C.⁴

¹GdL EBM AMCLI, Milano;

²UO Virologia, AO Ospedali Riuniti, Ancona;

³Gruppo di Lavoro "Riorganizzazione dei Laboratori di Microbiologia della Regione Marche";

⁴Dipartimento dei Servizi alla Persona e alla Comunità, Regione Marche

Scopi. Nelle Marche è in svolgimento un progetto di riorganizzazione dei laboratori di microbiologia, nell'ambito di un

più vasto processo coinvolgente tutti i laboratori della regione. Avendo come obiettivi il recupero di risorse, attraverso la razionalizzazione e il miglioramento degli *outcomes* sanitari, attraverso l'aumento del valore clinico del referto, il progetto utilizza due moderni strumenti: il trasferimento e l'esplicitazione delle conoscenze scientifiche ad operatori sanitari e pazienti (*Knowledge translation*) e il *Knowledge brokering*, che individua tutti gli interessati agli interventi sanitari basati sull'evidenza scientifica e li coinvolge nella loro attuazione pratica. In particolare, il progetto si prefigge di costruire network per rendere condivisibili nuove idee e iniziative per un uso più appropriato dei test.

Metodi. Sono stati istituiti in ambito regionale gruppi di lavoro (GdL) su temi particolari. Ad esempio, riguardo agli screening infettivologici all'atto del ricovero e pre-operatorio, l'obiettivo è convincere i clinici a sostituire lo screening con le precauzioni universali. I follow-up delle epatiti croniche da HBV e HCV andrebbero realizzati tenendo conto delle effettive performances dei test attualmente utilizzati. Per questi temi, i GdL hanno tratto indicazioni dalle linee guida disponibili e dalla letteratura internazionale. I gruppi si propongono dunque di interreagire con i clinici, per una reciproca *Knowledge translation* basata sulle prove di efficacia, e di organizzare riunioni allargate alle Direzioni Sanitarie e Generali, per attuare il *Knowledge brokering* e sviluppare progetti basati sull'evidenza scientifica. Sono state approntate allo scopo checklist di raccolta dati per valutare, in ambito regionale, l'approccio diagnostico e l'appropriatezza delle richieste in specifici settori ritenuti critici, quali le infezioni da Micobatteri, le infezioni genitali e le micosi. E' stato inoltre concepito un progetto forte di formazione a supporto del processo di riorganizzazione delle attività di microbiologia (AMCLI-Regione Marche), che coinvolgerà i clinici oltre ai microbiologi.

Risultati. I GdL hanno prodotto una serie di elaborati, consultabili a www.marcheinsalute.it.

Conclusioni. Lo scambio di notizie basate sull'evidenza scientifica tra le varie categorie di operatori sanitari costituiscono, a nostro parere, un promettente avvio ad un significativo miglioramento degli esiti clinici.

BIBLIOGRAFIA

1. Dave Davis, et al. The case for knowledge translation: shortening the journey from evidence to effect. *BMJ* 2003;327:335

P224

DISTOMATOSI EPATICA CON INUSUALE LOCALIZZAZIONE ANNESSIALE

Pierdomenico S.^o; De Francesco D.^o; Rocca F.*; Malacrida V.*.

^oU.O. Laboratorio Analisi * U.O. Medicina I ^

A.O. Ospedale di Busto Arsizio, P.le Solaro 3, 21052 Busto Arsizio VA

Obiettivi:

"Fasciola hepatica" è un trematode cosmopolita con localizzazione definitiva epato-biliare. Rara nell'uomo, permane endemica e con focolai epidemici nel 3° mondo. I controlli igienico-ambientali e la profilassi veterinaria sono essenziali per limitare l'infestazione umana e animale, data la bassa specificità parassitaria ed il biotopo obbligato "erba-acqua". L'occasionale interessamento dell'uomo sottolinea l'importanza dei controlli nella filiera alimentare.

Metodologia:

Nell'Aprile del 2003 il riscontro di anemia sideropenica (7,8 g/dL) in un soggetto di 22 anni, sesso femminile, origine

peruviana, ha posto in risalto il valore critico dell'esame parassitologico in un quadro ecografico caratterizzato da dilatazione delle VBP e massa annessiale dx di incerta definizione videolaparoscopica, tomografica e colecistografica retrograda (ERCP).

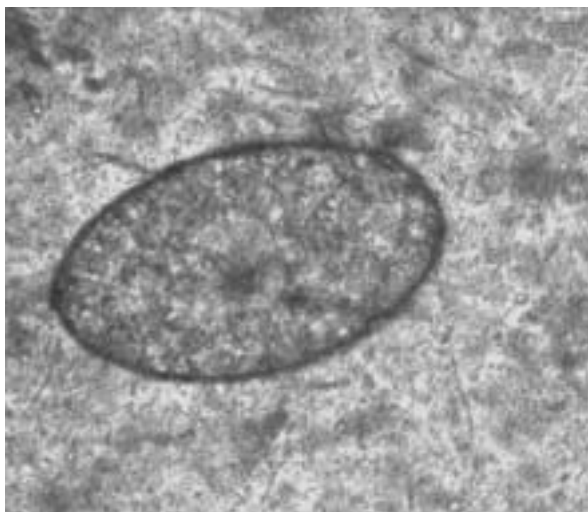
Risultati:

L'individuazione di uova di "Fasciola hepatica" nell'aspirato biliare e nelle feci (Fig. 1), pur non esaustiva per la possibile assunzione alimentare di fegato animale (ovino) parassitato, ha permesso l'inquadramento clinico di una sindrome complessa, risolta con terapia antielmintica sistemica (Biltricide) e bonifica locale (iodiopovidone).

Conclusioni:

Pur con bassa prevalenza (2.5% - popolazione afferente al nostro Ospedale), le parassitosi intestinali rappresentano ancora oggi un capitolo essenziale (a volte risolutivo) della microbiologica clinica. Il potenziamento dell'approccio analitico tradizionale con metodologie innovative (sieroinmunologiche, NAAT) appare auspicabile.

Fig. 1



P225

PROTOCOLLO DI DIAGNOSTICA LIQUORALE: DALLA TEORIA ALLA PRATICA

Pieretti B., Moretti M., Ghiandoni MG., Ciaschini G., Delprete E.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Ospedale S. Croce, Zona Territoriale N°3, Fano (PU)

Le meningiti batteriche rappresentano una realtà emergente nel nostro paese in quanto la loro incidenza è aumentata sia a livello locale che nazionale. Sono patologie più rare ma potenzialmente più gravi delle meningiti virali, e sono principalmente attribuibili a batteri quali: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus pneumoniae*.

Scopo di questo lavoro è verificare efficacia ed efficienza del "Protocollo di diagnostica liquorale" nella nostra realtà ospedaliera.

Nel periodo compreso tra il novembre 2003 ed il gennaio 2004, sono pervenuti al Laboratorio Analisi 20 richieste di indagine liquorale da diversi reparti, e sono stati isolati tre casi di meningite batterica in pazienti pediatrici: due causati

da *Neisseria meningitidis* (sierogruppo B e C) ed uno da *Streptococcus pneumoniae*.

I tre pazienti presentavano al momento del ricovero una sintomatologia specifica.

Il protocollo in uso nel nostro laboratorio prevede il prelievo di almeno 2 ml di liquor. Il materiale è sottoposto ad indagini chimico-fisiche, citometriche, microscopiche e microbiologiche.

Dall'esame chimico-fisico, dalla lettura dei preparati microscopici (colorazione microbiologiche ed ematologiche) e dalle reazioni di sierotipizzazione è possibile fornire al clinico in breve tempo un primo risultato preliminare che permette di orientarsi nella diagnosi differenziale di meningite, necessaria per una corretta e tempestiva impostazione della terapia antibiotica, e per l'eventuale profilassi sui soggetti esposti a rischio infettivo. La diagnosi richiede la massima rapidità e tempestività da parte del laboratorio e uno scambio di informazioni bidirezionale con il clinico, la Direzione Sanitaria ed il Servizio di Igiene e Prevenzione.

La buona pratica di laboratorio e la collaborazione con i reparti e la Direzione Sanitaria sono gli elementi chiave per gestire nel miglior modo possibile questo tipo di emergenze. Recentemente sono stati approvati dal Comitato per le Infezioni Ospedaliere del nostro ospedale i seguenti protocolli:

- 1 - "Protocollo per la gestione dei microrganismi sentinella",
- 2 - "Protocollo per la prevenzione e la protezione in casi di meningiti meningococciche".

P226

INCIDENZA DI INFEZIONI BATTERICHE NEL PAZIENTE TUMORALE. CONFRONTO FRA IL TRIENNIO 1988 - 90 ED IL TRIENNIO 2000 - 03.

Podda R., Porcu P.P., Sanna M.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia - Ospedale Oncologico "A. Businco" - Cagliari

Il paziente tumorale è facilmente esposto alle infezioni batteriche sia a causa delle alterazioni delle normali difese antimicrobiche, che per le terapie utilizzate per sconfiggere la malattia. Nel triennio 1988-90 vennero analizzati i dati microbiologici relativi a questi pazienti, il lavoro venne pubblicato su "L'Igiene Moderna". Il nostro scopo è quello di comparare questi dati con quelli del triennio 2000-2003.

Durante il triennio 1988-90 vennero rilevate 1132 infezioni in pazienti affetti da tumore. I materiali esaminati comprendevano: urine, espettorati, sangue, cateteri endovenosi, tamponi faringei etc.. L'identificazione dei campioni positivi venne eseguita con i sistemi API 20 e Oxifermtube. Nel triennio 2000-03 sono stati isolati 2236 campioni positivi (il nostro Ospedale ha raddoppiato il numero dei posti letto). Per l'identificazione è stato utilizzato il sistema Vitek1/2 della bioMérieux.

Risultati

Durante il triennio 1988-90 vennero isolati 122 Gram positivi (80 *S. aureo* e 42 *Streptococchi*) pari all'11% degli isolati. I Gram negativi furono 1010 (89%) così suddivisi: *E. coli* 329 (29%), *Proteus* spp. 167 (15%), *Pseudomonas* spp. 177 (16%), gruppo KES 319 (27%), altri 18 (2%).

Nel triennio 2000-03 sono stati isolati 855 Gram positivi corrispondenti al 38% del totale e 1381 Gram negativi (62%). I microrganismi più frequentemente isolati sono stati: tra i Gram positivi gli *Stafilococchi* coagulasi negativi con 402 casi (18%) e *S. aureo* 257 (11%); tra i Gram negativi *E. coli*

446 (20%), *Ps. aeruginosa* 476 (21%), *Proteus* spp. 84 (4%) e gruppo KES con 245 isolamenti (11%).

Conclusioni

Come si evince dai dati esposti vi è una significativa differenza tra i risultati dei due trienni confrontati: nel triennio a noi più prossimo vi è stato un notevole aumento delle infezioni dovute a patogeni opportunisti. I Gram positivi sono percentualmente aumentati (gli isolati di *S. coagulans* negativi hanno superato i casi di *S. aureo*); tra i gram negativi si evidenzia l'aumento delle infezioni da *Ps. aeruginosa*.

P227

ESPERIENZA VERONESE NELLA SIERODIAGNOSI DELLA MALATTIA DA GRAFFIO DI GATTO.

Tonolli E., *Rizzonelli P., Fontana R.

Servizio di Microbiologia, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera di Verona, *Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Ospedale S. Maria del Carmine, Rovereto (TN).

Introduzione

La "malattia da graffio di gatto" (CSD) è una zoonosi che si manifesta con linfadenopatia regionale associata a graffio di gatto. Il principale agente eziologico di CSD è *Bartonella henselae* piccolo bacillo gram negativo, pleomorfo, aerobio, ossidasi negativo, a lenta crescita. La CSD è solitamente autolimitante ma in alcuni casi possono comparire complicazioni gravi come ascessi epatici e splenici, linfadenopatia diffusa e manifestazioni a carico del sistema nervoso centrale. Mentre per decenni la diagnosi è stata esclusivamente clinica, oggi può essere confermata da indagini di laboratorio quali esame culturale, biologia molecolare e ricerca di anticorpi specifici.

Scopo del lavoro

È stato fatto uno studio epidemiologico su base sierologica di CSD nel bacino d'utenza dell'Azienda Ospedaliera di Verona e si è valutata l'utilità del test sierologico nella diagnosi di tale malattia.

Materiali e metodi

Nel periodo settembre 2002-agosto 2003 sono pervenuti al Servizio di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera di Verona 142 sieri per la ricerca di anticorpi IgG e IgM anti-*Bartonella henselae*. È stato impiegato un test in immunofluorescenza indiretta (MRL Diagnostics, Cypress, California). Per la determinazione delle IgG si è utilizzato come screening la diluizione 1:128; i campioni positivi sono stati titolati. Per la determinazione delle IgM si è utilizzata la diluizione 1:20. Per l'interpretazione dei risultati si è fatto riferimento alle indicazioni riportate dal kit.

Risultati

Sono stati testati 142 pazienti di cui 86 (65%) di età inferiore a 20 anni. Di tutti i campioni pervenuti solo 25 (17%) risultavano significativamente positivi per CSD: presenza di IgM specifiche e/o IgG con un titolo > 1:256. Per questi 25 pazienti, 16 (64%) dei quali di età inferiore ai 20 anni, il dato sierologico confermava il sospetto clinico.

È stato, inoltre, osservato un significativo andamento stagionale con un picco di sieropositività nel periodo autunno-inverno.

Conclusioni

Nella nostra esperienza i risultati sierologicamente significativi correlavano con il sospetto clinico e contribuivano a fare diagnosi di CSD. Si ritiene quindi che il test in immunofluorescenza indiretta per la determinazione di anticorpi anti-*B.henselae* abbia un elevato valore predittivo positivo per diagnosi di CSD quando la richiesta sia motivata da un forte sospetto clinico.

P228

RUOLO DELL'ESTRATTO DI THYMUS VULGARIS E SALVIA OFFICINALIS NELL'IGIENE INTIMA.

Sturla C., Tosi M.T., Montuori M., Mancini R.

*Microbiologia, Ostetricia e Ginecologia, Azienda Ospedaliera "S. Antonio Abate di Gallarate (VA)

Obiettivi. Valutare il ruolo di sostanze naturali nell'igiene intima per proteggere/ripristinare l'ambiente vaginale, a rischio di contaminazione da microrganismi, che diventano patogeni in seguito ad alterazioni dell'omeostasi vaginale.

L'integrità di questo ecosistema dinamico è preservata da: pH acido, che inibisce microrganismi (*Candida Albicans*, *Escherichia Coli*, *Gardnerella Vaginalis*) causa di Vaginosi Batterica (pH >4.7 segno di vaginosi) e *Lattobacilli* che degradano il glicogeno ad acido lattico.

Metodologia. Esaminare le proprietà farmacologiche e microbiologiche degli estratti vegetali, in particolare Thymus vulgaris e Salvia officinalis, largamente impiegati nell'igiene intima.

Risultati. L'estratto di Salvia possiede un'attività antinfiammatoria; antibatterica su gram negativi e positivi; antimicotica (tra cui *Candida albicans*), antivirale (*Herpes virus*, *Influenza virus*, *Vaccinia virus*); immunomodulatrice (modesta attività IFN-like con inibizione dell'effetto citopatico del virus dell'encefalomiocardite); antiossidante sul perossinitrito che ossida vari costituenti cellulari (sulfidrilici e lipidi) e può causare morte cellulare, carcinogenesi e invecchiamento.

L'estratto di Thymus (essenzialmente timolo e carvacrolo) esplica attività antibatterica e antimicotica (*Streptococcus hemoliticus*, *Stafilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) per contatto diretto e lascia pressoché inalterato il *Lattoacillus*. Il timo è attivo nella Tinea pedis sperimentale e nell'uomo. Tra i composti fenolici, timolo e carvacrolo sono i più fungotossici e inibiscono perossidazione lipidica e radicali liberi, con la più elevata capacità di assorbimento di radicali ossigeno tra vari estratti.

Agiscono mediante distruzione di parete cellulare batterica e membrana citoplasmatica, rottura dello strato esterno liposaccaridico della membrana cellulare con parziale disintegrazione della membrana esterna e fuoriuscita di citoplasma.

Conclusioni. Gli estratti di salvia e thymus possiedono proprietà microbiologiche adeguate all'impiego nell'igiene intima femminile, che beneficiano della sinergia d'azione in combinazione con sistemi tampone del pH (siero di latte e acido lattico), ac. a-chetoglutarico (azione deodorante e antiossidante mediante blocco dei radicali aminici di ammoniaca e urea) e blandi tensioattivi.

P229

VAGINITI IN GRAVIDANZA: RELAZIONE CON LA ROTTURA PREMATURA DELLE MEMBRANE E IL PARTO PRETERMINE

Venditti W., Lisanti N., Maltese R., Di Fino F.

Struttura semplice di Microbiologia
U.O. di Ostetricia e Ginecologia *
P. O. di Castrovillari A. S. 2 Castrovillari (cs)

Le vaginiti rappresentano una condizione clinica in costante aumento: ne esistono diversi tipi, ciascuno con caratteristiche particolari dovute al microrganismo che le provoca.

La vaginosi batterica (VB) è la più frequente infezione vaginale nella donna in età fertile, può essere definita come una complessa modificazione della flora batterica vaginale che causa un'alterazione del normale ecosistema vaginale: vi è una riduzione di Lactobacilli fisiologicamente presenti (produttori di H₂O₂) ed un aumento di altri batteri tra i quali la *Gardnerella vaginalis* (di gran lunga la più frequente), *Ureaplasma urealyticum*, anaerobi, peptostreptococchi.

Abbiamo ancora la vaginite causata dal protozoo *Trichomonas vaginalis*, la cui trasmissione avviene prevalentemente con il rapporto sessuale.

La vulvovaginite sostenuta invece da miceti del genere *Candida* è una condizione infiammatoria la cui incidenza è in aumento nei paesi occidentali.

La composizione della flora vaginale è piuttosto eterogenea ed è influenzata da molte variabili tra le quali la gravidanza. In tale condizione si assiste a notevoli variazioni emodinamiche, ormonali ed omeostatiche, tali da indurre modificazioni a carico dell'ambiente vaginale; in gravidanza vi è una maggiore sensibilità alle infezioni: ciò è correlato all'elevato tasso ormonale che favorisce la colonizzazione di alcuni microrganismi ed allo stato di immunosoppressione fisiologica caratteristica di tale condizione.

Il rapporto tra infezioni del tratto genitale inferiore e complicanze ostetriche, rappresentate soprattutto da Rottura prematura delle membrane (PROM) e Parto pretermine (PPT) costituisce un argomento di rilevante interesse clinico; numerose sono le evidenze che attestano come la genesi infettiva rappresenti una eziologia frequente nella nascita pretermine.

Il precoce riconoscimento della genesi infettiva può permettere di modificare l'esito delle gravidanze complicate da tali affezioni.

Materiali e metodi

La necessità sempre crescente di arrivare ad una diagnosi precoce e precisa ha determinato lo sviluppo, in questi anni, di tecniche diagnostiche molecolari destinate alla rivelazione ed alla identificazione dell'acido nucleico di alcune specie batteriche e virali. Per l'identificazione di *Candida*, *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis* è stata utilizzata nella nostra ricerca una tecnica basata sulla ibridizzazione dell'acido nucleico.

Abbiamo sottoposto donne gravide tra la 10^a e 24^a settimana di gestazione a duplice tampone vaginale: uno era esaminato con sonde molecolari ed uno per via colturale tradizionale.

I criteri di inclusione nello studio erano determinati, nella fascia di interesse, dalla positività della sintomatologia clinica (leucorrea, bruciore, prurito) nell'ambito di una gravidanza per altri versi regolare.

Erano escluse dallo studio le pazienti in precedenza trattate con farmaci topici e/o sistemici.

L'età delle pazienti interessate era compresa tra i 20 e 37 anni.

Le pazienti risultate positive per infezione hanno effettuato la seguente terapia: nella VB da *Gardnerella vaginalis* sono state trattate per via sistemica con Metronidazolo cpr 2 gr. Per os in unica somministrazione e localmente con candele vaginali di Metronidazolo (500mg) per sette giorni. Stessa terapia con Metronidazolo per via sistemica e locale nell'infezione da *Trichomonas vaginalis* (per via sistemica è stato trattato anche il partner).

Nella Candidosi sono stati trattati entrambi i partners con Fluconazolo cpr 150 mg in un'unica somministrazione ripetuta dopo una settimana.

Le pazienti sono state trattate inoltre, localmente per sette giorni con Isoconazolo crema ed Econazolo soluzione ginecologica; efficace anche l'applicazione di un singolo ovulo vaginale di Isoconazolo (600mg) o Sertaconazolo (300mg).

Le pazienti positive ad altri germi sono state trattate in base all'esito dell'antibiogramma; Dopo tre settimane dalla tera-

pia sono state sottoposte a controllo tramite un duplice tampone vaginale ed in caso di persistenza della positività, sottoposte ad ulteriori cicli terapeutici. Tutte, venivano monitorizzate nel corso della gravidanza fino all'espletamento del parto: veniva osservata la modalità del parto e le eventuali anomalie verificatesi, in particolare veniva valutata la Rottura prematura delle membrane e la correlazione col Parto Pretermine.

Risultati

I risultati ottenuti su 48 donne sintomatiche sono stati i seguenti:

- 12 positivi per *Gardnerella vaginalis* pari al 25%;
- 9 positivi per *Candida* pari al 18,7%;
- 3 positivi per *Candida* e *Gardnerella v.* pari al 6,25%;
- 2 positivi per *Streptococcus agalactiae* pari al 4,1%;
- 1 positivo per *Trichomonas vaginalis* pari al 2,0%;
- 21 negativi per batteri e miceti pari al 43,7%.

Il monitoraggio delle gravide sino al parto ha evidenziato quanto segue:

Nei 12 casi di positività alla *Gardnerella v.* si sono verificati 2 casi PROM con PPT (16,6%), di cui uno alla 34^a settimana ed uno alla 36^a.

Nei 21 casi di negatività solo un caso (4,7%) di PROM e PPT alla 36^a settimana.

Nei restanti 15 casi di infezione da *Candida* e *Gardnerella v.*, *Trichomonas v.* e *Streptococcus a.*, non si è verificata né PROM né PPT, tuttavia in un caso di candidosi, resistente a terapia si è verificata al parto un'estesa lacerazione vaginale per compromissione della mucosa.

In tutti i casi, i feti non hanno subito complicazioni.

Conclusioni

I risultati dello studio effettuato sono in accordo con la recente letteratura che sottolinea l'importanza in gravidanza della v. sostenuta dalla *Gardnerella vaginalis* nel determinismo di complicanze quali la PROM e PPT che si attestano intorno al 16%. Al contrario il risultato riscontrato nelle pazienti (21) con esame negativo è stato del 4,7%, al di sotto dell'8% previsto nella popolazione generale. È da segnalare l'utilità delle sonde molecolari che hanno notevolmente ridotto i tempi d'attesa dei risultati (circa tre giorni della coltura a fronte di circa un'ora dal prelievo della metodica molecolare) consentendo di instaurare un trattamento terapeutico immediato per contrastare precocemente ed adeguatamente le possibili complicanze.

BIBLIOGRAFIA

1. Hill G.B.: The microbiology vaginosis. Am. J. Obstet. Gynecol. 1993; 169:450-454
2. Mead P.B.: Epidemiology of bacterial vaginosis. Am. J. Obstet. Gynecol. 1993; 169, 446-449
3. Kurki T., Sivonen A., Savia E., Ylikorkala O.: bacterial vaginosis in early pregnancy outcome. Obstet. gynecol. 1992; 80:173-177
4. McDonald H.M., O'Loughlin J. A.; Vigneswaron R., McDonald P. I.: Prenatal microbiological risk factors associated with preterm birth. Br. J. Obstet. Gynecol. 1992; 99; 190-196
5. Eschembach D. A., Hillier S., Critchlow C., Stevens C., De Rouen T., Holmes K. K.: Diagnosis and clinical manifestation of bacterial vaginosis. Am. J. Obstet. Gynecol. 1988; 158; 819-828
6. Romero R. Mazon M.: Infection and preterm labor. Clin. Obstet. Gynecol. 1988; vol 31 N°3
7. Lamont R. F., Taylor-Robinson D., Newman M., Wigglesworth J., Elder M. G.: Spontaneous Early Preterm Labor Associated with Abnormal Genital Colonization. Br. J. Obstet. Gynecol. 1992; 99; 190-196
8. Sparks J.M.: Vaginitis J. Reprod Med 1991; 36; 745-752

P230

DOPPIA INFESTAZIONE DA *STRONGYLOIDES STERCORALIS* E *SCHISTOSOMA MANSONI* IN UN SOGGETTO EXTRACOMUNITARIO.

Andriulo B., Muolo V., Ostuni AM., Vinci E, *Miragliotta G.

U.O. Patologia Clinica Ostuni-Fasano, AUSL BR/I

*Sezione di Microbiologia, Dipartimento MIDIM, Università di Bari.

Caso clinico. Uomo di 46 anni, nazionalità eritrea, da alcune settimane in Italia si presenta in ospedale con algie addominali diffuse, alvo irregolare, vomito alimentare ed iperiperessia persistente (39.0 °C). L'esame obiettivo evidenzia dolore alla palpazione profonda, soprattutto alla fossa iliaca destra.

Indagini. Diagnostica per immagini: presenza di multipli livelli idroaerei digiuno-ileali e lieve splenomegalia.

Diagnostica di laboratorio: anemia (Hb 10,7 g/dL) con anisocitosi, leucopenia (WBC 2.670 /uL), eosinofilia (9,3%), ematuria e proteinuria (30 mg/dl), VES 1h 78 mm.

Esame parassitologico delle feci (a fresco): numerose larve rabditoidi tipiche di *Strongyloides stercoralis* (bocca brevissima, esofago rabditoide, abbozzo genitale, apertura cloacale) e uova di *Schistosoma mansoni*.

Diagnosi clinica: ileo paralitico da iniziale iperinfestazione da *S. stercoralis* e successiva infestazione da *S. mansoni*.

Conclusioni. Il quadro parassitologico osservato è indicativo di una nuova epidemiologia infettivologica legata alla attuale realtà di nuove etnie presenti nel territorio. Tale situazione richiede che il clinico ed il microbiologo siano pronti al nuovo impatto.

P231

DESCRIZIONE DI UN CASO DI STRONGILOIDIASI IN UN SOGGETTO ABRUZZESE AFFETTO DA MORBO DI WERLHOF.

Fazii P.¹, Dragani A.², Clerico L.¹, Malizia R.², Pelatti A.¹, Stella M.¹, Crescenzi C.¹, Pistola F.¹, Russi C.¹, Riario Sforza G.¹.

¹Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia,

²Dipartimento di Ematologia, P.O. "Spirito Santo",

Via Fonte Romana 8, 65124 - Pescara.

Strongyloides stercoralis (Ss) è un piccolo nematode capace di provocare un'infestazione cronica intestinale, la strongiloidiasi, solitamente silente, ma che, in situazioni di immunodepressione dell'ospite, può essere causa di forme morbose gravi ed anche letali.

Descriviamo un caso di strongiloidiasi pervenuto alla nostra osservazione nel giugno 2003. Si è trattato di un soggetto di sesso maschile di 71 anni, nato e residente a Pescara, pensionato, ex artigiano, il quale non era mai stato in zone endemiche per la strongiloidiasi. Da alcuni anni egli era affetto da porpora trombocitopenica idiopatica (morbo di Werlhof) e, per tale motivo, era controllato periodicamente presso gli ambulatori del Dipartimento di Ematologia del nosocomio pescarese. Un aggravamento del quadro clinico (gengivorragia, epistassi, piastrine=27.000/mm³) associato alla presenza di auto-anticorpi anti-cardiolipina, consigliarono l'effettuazione di cicli di terapia con corticosteroidi. In seguito a questa terapia si notò il miglioramento del quadro sintomatolo-

gico ma parallelamente la comparsa di un'ipereosinofilia periferica che indusse gli ematologi a richiedere un esame parassitologico delle feci.

All'esame parassitologico diretto furono osservate larve rabditoidi di Ss. Fu quindi intrapresa una terapia anti-elmintica con Albendazolo. I controlli parassitologici successivi, eseguiti mediante osservazione diretta e dopo concentrazione fecale e mediante coltura su Agar per Ss secondo Arakaki, non hanno evidenziato la presenza di larve di Ss. Gli esami emocromocitometrici parallelamente effettuati non hanno più evidenziato ipereosinofilia.

Ss è endemico nelle regioni tropicali e subtropicali, mentre in Italia presenta delle nicchie di endemia in zone umide della Val Padana (province di Pavia, Lodi, Brescia, Rovigo) ed in alcuni centri del lago Trasimeno e della valle del Tevere (provincia di Perugia). Sporadiche sono state le segnalazioni nelle altre regioni.

In Abruzzo non sono mai stati segnalati in letteratura casi di strongiloidiasi. Sono stati però osservati casi in provincia di Chieti (Lanciano, Casoli), nell'area peligna e nella zona del Fucino (provincia di L'Aquila). Il nostro paziente è stato contagiato verosimilmente da adolescente, in quanto per circa un anno, durante la seconda guerra mondiale, era stato "sfollato" in una zona rurale del teramano (comune di Notaresco) dove ricorda che era solito giocare a piedi nudi sulla terra. Segnaliamo il caso per la rarità delle descrizioni nel Centro-Sud d'Italia.

P232

UN METODO REAL-TIME PCR PER L'IDENTIFICAZIONE DI *PLASMODIUM MALARIAE* NEL SANGUE DI PAZIENTI CON MALARIA.

Perandin F., Manca N., Calderaro A.¹, Piccolo G.¹, Galati L.¹, Ricci L.², Medici M.C.¹, Arcangeletti M.C.¹, Snounou G.³, Dettori G.¹, Chezzi C.¹.

Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia;

¹Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Parma;

²Arcispedale di Reggio Emilia;

³Unità di Parassitologia Biomedica & CNRS URA 2581, Istituto Pasteur, Parigi.

È stato sviluppato e valutato un saggio molecolare di tipo qualitativo Real-time PCR (sistema "Taq man", Applera) per la rivelazione di una regione del 18S rDNA di *Plasmodium malariae*. Lo studio è stato condotto su 25 campioni di sangue intero provenienti da altrettanti pazienti con sospetta malaria d'importazione. Il nuovo saggio è stato valutato in confronto con l'indagine microscopica, metodo di riferimento per la diagnosi di laboratorio di malaria, e con un saggio di nested-PCR specie-specifica. La specificità del saggio Real-time PCR è stata confermata dall'assenza di "cross-reattività" nei confronti di DNA estratto da colture di *Toxoplasma gondii* e *Leishmania infantum*, dall'assenza di positività con campioni negativi per la presenza di plasmodi (12/12) e dall'analisi di sequenza di tutti i prodotti ottenuti dopo PCR dei campioni positivi. Inoltre, il saggio Real-time PCR non ha mai dato "cross reattività" con DNA proveniente da campioni positivi per *P. falciparum* (5 casi), *P. vivax* (1 caso) e *P. ovale* (2 casi), rispettivamente, sia nel caso di infezioni singole che di infezioni miste. Il saggio Real-time PCR ha mostrato una sensibilità analitica di 3 parassiti/ml ed è stata in grado di identificare *P. malariae* anche in quei casi (3/13) in cui l'indagine microscopica non ha consentito l'i-

dentificazione. Inoltre, come il saggio nested-PCR, quello Real time PCR ha identificato il DNA di *P. malariae* in campioni contenenti anche altre specie di plasmodi (4/13). In conclusione, il saggio Real-time PCR specifico per *P. malariae* risulta essere altamente sensibile e specifico (100%), di semplice e rapida esecuzione (2 ore) e non richiede manipolazione dei prodotti di PCR, riducendo i rischi di contaminazione. Perciò il sistema può essere vantaggiosamente impiegato nella pratica quotidiana di laboratorio per la diagnosi di malaria, come supporto all'esame microscopico, soprattutto nei casi di bassa parassitemia o nelle infezioni miste.