

comunicazioni orali

SESSIONE 2

Il Laboratorio di Microbiologia e la gestione delle infezioni in ambito nosocomiale e comunitario

Martedì 19 Settembre 2006, ore 14.00 - 18.00, Sala GIALLA

CO2.1

ASPETTI MICROBIOLOGICI E CLINICI DELLE POLMONITI ASSOCIATE A VENTILAZIONE (VAP)

Molinis M.*, Bonaccorso G.°, Cavallaro A.*, Scarin M.*

*Microbiologia-Virologia Azienda Ospedaliera di Padova

°Rianimazione Centrale Azienda Ospedaliera di Padova

Introduzione.

La VAP è tra le più frequenti infezioni in UTI (fino al 60%) con incidenze che possono arrivare al 30% e mortalità al 70%. Una antibioticoterapia precoce e adeguata condiziona l'esito favorevole della VAP. Le indagini microbiologiche in associazione con i dati clinici rappresentano un momento fondamentale per la diagnosi e la scelta di una terapia antimicrobica razionale.

Materiali e metodi.

Nel 2005 in UTI sono stati sottoposti a VM 606 pazienti in 29 dei quali è stata diagnosticata una VAP (4,7%) in base a criteri clinici e microbiologici (esame microscopico al Gram, colture quantitative di broncoaspirato o lavaggio broncoalveolare ed emocolture).

Risultati.

La terapia antimicrobica e i dati microbiologici sono stati analizzati nei primi 10 giorni di ricovero, dal 10° al 30° giorno e dopo il 30°.

Primi 10 giorni.

Terapia empirica modificata completamente in 5 casi (patogeno non coperto dalla terapia empirica); per de-escalation in 8 e aggiunta di un antibiotico in 6 pazienti. In questi 19 pazienti, la diagnosi di VAP è stata posta nei primi 10 giorni di VM.

Periodo tra 10° e 30° giorno.

Terapia modificata in 3 per comparsa di patogeni non coperti dalla terapia, in 7 per modificazione del profilo di resistenza.

Periodo successivo al 30° giorno.

Nessun cambiamento di terapia in quanto i profili di antibioticoresistenza sono rimasti immutati e non si è avuta comparsa di nuovi patogeni.

Conclusioni.

Il dato clinico è risultato importante in 10 pazienti nei primi 10 giorni mentre quello microbiologico ha modificato la terapia clinica nei primi 10 giorni nel 66% dei pazienti. Risulta evidente la stretta collaborazione tra clinico e microbiologo per diagnosticare e impostare precocemente una terapia razionale delle VAP.

CO2.2

EPIDEMIA DA BURKHOLDERIA CEPACIA ASSOCIATA ALL'USO DI UN COLLUTTORIO CONTAMINATO: INDAGINE EPIDEMIOLOGICA E STUDIO MOLECOLARE DEGLI ISOLATI

Pecorari M., Govi V., Tamassia M.G., Sabbatini A.M.T., Gennari W., Fabio G., Venturelli C., Piccinini L., Girardis M.*, Marchegiano P., Scannavini P.**, Barbieri M.**, Casolari C.**

Dipartimento Integrato Servizi Diagnostici e Laboratorio e Medicina Legale,
Sezione di Microbiologia e Virologia, Policlinico, Modena;

* Dipartimento Integrato Chirurgia Generale e Specialità Chirurgiche, Policlinico, Modena;

** Direzione Sanitaria, Policlinico, Modena

Introduzione.

Burkholderia cepacia è un microrganismo Gram negativo tipicamente ambientale, capace di sopravvivere nell'acqua, in condizioni minimali di nutrimento.

Conosciuto da tempo come causa di polmonite in soggetti con fibrosi cistica, è oggi considerato un patogeno emergente responsabile di infezioni opportunistiche

in pazienti ospedalizzati.

È segnalato all'origine di epidemie nosocomiali da fonte comune, identificata per lo più in soluzioni disinfettanti contaminate.

Scopo della presente ricerca è lo studio epidemiologico e molecolare di un evento epidemico da *B. cepacia* occorso in due reparti di terapia intensiva del Policlinico di Modena, da gennaio 2005 a marzo 2006.

Metodi.

L'indagine epidemiologica ha coinvolto 38 pazienti, tutti con colture positive dei materiali respiratori, 29 colonizzati e 9 affetti da polmonite.

Sono stati conservati e studiati tutti i ceppi di *B. cepacia* isolati nel periodo suddetto da tutti i reparti di degenza dell'ospedale ed è stata ricercata una fonte comune dei casi a partire da numerosi campioni di sorveglianza.

Complessivamente 58 stipiti sono stati sottoposti a tipizzazione molecolare con metodo RAPD-PCR e all'analisi filogenetica.

Risultati.

Dopo un anno dall'inizio dell'evento, un ceppo di *B. cepacia* si ritrovava nell'acqua deionizzata utilizzata dalla Farmacia dell'ospedale nella preparazione di un collutorio a base di clorexidina destinato ai pazienti dei reparti di rianimazione.

Tutti i ceppi clinici e quelli isolati dal collutorio (clorexidina al 4%) appartenevano al medesimo genotipo. Genotipi differenti si ritrovavano invece negli isolati dall'acqua deionizzata.

Conclusioni.

Verosimilmente l'azione della clorexidina ha selezionato un clone resistente a partire dalla popolazione microbica presente nell'acqua, responsabile dei casi di infezione e di colonizzazione.

La sospensione dell'uso del collutorio ha determinato la cessazione immediata degli isolamenti, confermando il rapporto tra il disinfettante e l'insorgenza dei casi già indicato dai risultati dalla tipizzazione molecolare. Una sola segnalazione in letteratura associa infezioni respiratorie da *B. cepacia* all'uso di un collutorio a base di clorexidina (1).

Lo studio di questo episodio conferma il ruolo di colluttori non alcolici nel determinare infezioni in pazienti sottoposti a ventilazione forzata e sottolinea il valore di accurate indagini epidemiologiche nella risoluzione di un evento epidemico.

CO2.3

MICRONET: UNA RETE INFORMATIZZATA PER LA RACCOLTA DATI MULTICENTRICA DA LABORATORI DI MICROBIOLOGIA

D'Ancona F., Rizzo.C., Alfonsi V., Ciofi Degli Atti ML. e il Gruppo di Lavoro Micronet

*Centro Nazionale di Epidemiologia,
Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS)
- Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena 299 00161, Roma*

Introduzione.

La necessità di raccogliere informazioni dettagliate riguardo le malattie infettive e l'eziologia di alcuni quadri clinici ha condotto alla attivazione di sistemi di sorveglianza in supporto alle fonti informative istituzionali esistenti come il Sistema Informatizzato delle Malattie Infettive (SIMI). Tutte queste attività hanno gravato sulle attività del microbiologo clinico. Per questa ragione l'ISS sta sviluppando in collaborazione con il CCM del Ministero della Salute, una sorveglianza di laboratorio automatizzata per la raccolta dati dai laboratori di Microbiologia. Essa è basata sulla trasmissione automatica dei risultati di accertamento etiologico infettivo.

Metodi.

Nella prima fase pilota del Progetto sono stati individuati i partecipanti rappresentati sia da laboratori pilota che da Regioni che si sono organizzate per inviare i dati in tempo reale (Regione Piemonte e Gruppo di laboratori pilota: Bergamo, Bari, Bolzano). L'approccio metodologico parte dalle richieste di esami al laboratorio e si avvale della possibilità di esportare tutti gli accertamenti (positivi e negativi) effettuati nel laboratorio di microbiologia e disponibili nel sistema di refertazione del laboratorio stesso.

Risultati.

La creazione di uno standard di interscambio dati tra i laboratori attraverso un set di tabelle normalizzate ha permesso di uniformare le informazioni provenienti dai diversi laboratori. Il data-set prodotto permetterà di descrivere la frequenza di patogeni principalmente per area geografica (nord, centro e sud), ma anche di monitorare costantemente la circolazione di patogeni intra-ospedalieri con particolare attenzione alla resistenza agli antibiotici. E' prevista la creazione di un sito web che permetterà ai partecipanti di consultare i loro dati aggregati.

Conclusioni.

Micronet rappresenta quindi un'importante base di partenza per poter stabilire dei network regionali dei laboratori di microbiologia che possano confluire al livello nazionale creando un modello per la condivisione e trasmissione di dati di laboratorio in modo da standardizzare le procedure di raccolta del dato microbiologico.

comunicazioni orali

SESSIONE 3

Infezioni urogenitali a eziologia batterica: diagnosi dell'infertilità su base infettiva

Martedì 19 Settembre 2006, ore 14.00 - 18.00, Sala 500

CO3.1

PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA CHLAMYDIA TRACHOMATIS NELLA POPOLAZIONE GIOVANILE.

Latino M.A., Rosso C., De Intinis G., De Maria D., In Torcia P., Caneparo A.

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

Introduzione.

L'infezione da Chlamydia trachomatis (C.t.) rappresenta una delle infezioni batteriche sessualmente trasmesse più diffusa in tutti i paesi industrializzati. L'Organizzazione mondiale della Sanità stima che ogni anno nel mondo vi siano almeno 92 milioni di nuovi casi di infezione di cui circa 5 milioni in Europa con una prevalenza del 3-6% nella popolazione adulta. La principale complicanza dell'infezione da C.t. è rappresentata dalla Malattia Infiammatoria Pelvica (MIP), che spesso decorre in modo paucisintomatico causando, a sua volta, sviluppo di lesioni cicatriziali ed aderenze pelviche con algie pelviche croniche. Le alterazioni cicatriziali possono portare ad un'occlusione tubarica con conseguente sterilità e gravidanza ectopica. Le caratteristiche di diffusione dell'infezione, la sintomatologia pressoché assente, il peso economico e sociale delle complicanze a medio e lungo termine soprattutto nella donna, impongono un'attenta analisi delle possibili strategie di prevenzione da attuare per incidere in modo efficace su un problema le cui sequenze fanno parte della quotidianità sul piano sanitario ed assistenziale.

Obiettivi.

Scopo dello studio è stato quello di stimare la prevalenza dell'infezione da C.t. nella popolazione giovanile torinese e di individuare i gruppi a maggior rischio per poter acquisire elementi utili alla definizione di eventuali politiche di screening da realizzarsi sulla

popolazione piemontese.

Metodi.

La popolazione è stata arruolata attraverso alcuni Centri per le Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST) e consultori familiari cui è stato fornito un questionario da compilare, una brochure informativa sull'infezione da C.t. trachomatis ed il kit per l'esecuzione del prelievo vaginale in accordo con gli studi più recenti che individuano questo tipo di prelievo come un valido campione alternativo per la diagnosi delle infezioni da C.t. I test sono stati eseguiti col kit TMA Gen Probe Amplified Chlamydia trachomatis (BioMérieux) il cui target di amplificazione è l'RNA ribosomiale previo raggruppamento in pools di 5 campioni ciascuno, al fine di contenere i costi. I pools risultati positivi sono stati quindi riesaminati come singoli campioni.

Risultati.

Dal 1° Marzo 2004 al 28 Febbraio 2006 sono state arruolate 1.180 giovani donne di età compresa tra i 18 ed i 24 anni: la prevalenza globale dell'infezione da Chlamydia trachomatis (C.t.) è stata del 10.4%. Onde poter valutare gli eventuali fattori di rischio associati all'infezione sono stati indagati differenti parametri sia socio-demografici sia comportamentali elencati nella tabella seguente

	Totale casi	Positive	p
Età 1° rapporto			
13-15	266	38 (14.3%)	0.001
> 15	871	76 (8.7%)	
ND	43	9 (20.9%)	
Partner stabile			
Si	982	80 (8.1%)	0.001
No	168	34 (20.2%)	
ND	30	9 (30%)	
Partners ultimi 6 mesi			
1	216	19 (8.8%)	0.001
> 1	51	20 (39.2%)	
ND	15	4	
Partners occasionali			
Si	68	23 (33.8%)	0.001
No	235	14 (6%)	
ND	24	6	

Pregresse IST

Sì	32	10 (32.3%)	0.001
No	286	28 (9.8%)	
ND	9	5	

Disturbi nel partner

Sì	47	12 (25.5%)	0.001
No	246	22 (8.9%)	
ND	34	9	

Conclusioni.

In accordo con i dati della letteratura internazionale, i fattori di rischio da noi individuati sono stati: la giovane età del primo rapporto sessuale, non avere un partner stabile, l'aver avuto uno o più partners occasionali o più di un partner negli ultimi 6 mesi una storia di pregresse IST, la presenza di una sintomatologia genitale nel partner. I dati ad oggi in nostro possesso ci indicano che 221 donne (67.6%) hanno almeno un altro fattore di rischio oltre la giovane età ed in questo gruppo la prevalenza dell'infezione da C.t. è del 18.6%. In 260 casi è stato anche possibile ricercare la presenza di altre IST che sono state diagnosticate in 27 pazienti (10.4%).

CO3.2**BACTEROIDES THETAOTAOMICRON ED INFEZIONE POSTISTERECTOMIA**

Del Gaudio T.¹, Tajani E.², Miragliotta G.³, Mosca A.³

¹Laboratorio Analisi P.O. di Andria,

²U.O. Ostetricia e Ginecologia P.O. di Andria, AUSL BAT/I, 70031 Andria

³Sezione di Microbiologia, Dipart. MIDIM, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Bari, 70124 Bari

Introduzione.

Le infezioni conseguenti ad isterectomia transvaginale non sono ancora completamente conosciute. Sebbene la flora endogena vaginale rappresenti l'origine dell'infezione per via ascendente, non sono definiti i fattori di rischio che determinano la formazione di ascesso a livello della cupola vaginale, pur in presenza di adeguata risposta dei meccanismi di difesa della paziente.

Metodi.

Viene presentato il caso di una paziente di 44 anni, sottoposta ad isterectomia per utero fibromiomaso, prolasso uterino ed ipermenorrea, con successiva formazione di ascesso della cupola vaginale. L'indagine microbiologica del materiale purulento raccolto con drenaggio intraoperatoriamente è consistita in esame batterioscopico previa colorazione di Gram, coltivazioni in aerobiosi/anaerobiosi, identificazione median-

te Rapid API-32A system (bio-Mérieux, Italia) e conferma con Hewlett-Packard 6890 series gas liquid chromatography system, sensibilità antibiotica con E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). È stato analogamente processato un tampone vaginale eseguito contemporaneamente.

Risultati.

Tanto dal materiale purulento quanto dal tampone vaginale è stato isolato in coltura pura ed identificato *Bacteroides thetaiotaomicron* (percentuale di identificazione con Rapid API-32° 99.9%; profilo di similarità all'esame gas-cromatografico 0,608 (prima scelta). *B. thetaiotaomicron* è risultato beta-lattamasi positivo, sensibile ad Amoxicillina/clavulanato (MIC 0.75 µg/mL), metronidazolo (2 µg/mL), imipenem (0.25 µg/mL), moxifloxacin (1.5 µg/mL); resistente ad amoxicillina (256 µg/mL), piperacillina-tazobactam (256 µg/mL), e cefoxitin (256 µg/mL).

Conclusioni.

Le infezioni genitali femminili sono solitamente miste e *B. thetaiotaomicron* è stato raramente isolato (<1%). Lo spettro di sensibilità antibiotica è risultato interessante perché la resistenza a piperacillina-tazobactam è rara mentre è confermata la piena sensibilità a moxifloxacin malgrado la recente descritta tendenza alla resistenza ai fluorochinoloni da parte di *Bacteroides* spp. L'accurata identificazione del batterio responsabile appare pertanto importante sia per la definizione della storia naturale e dei sintomi clinici della infezione sia per la verifica del pattern di sensibilità antibiotica.

comunicazioni orali

SESSIONE 4

Le infezioni virali del tratto genito-urinario

Mercoledì 20 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, Sala 500

CO4.1

DIAGNOSI E TIPIZZAZIONE DI HPV IN PAZIENTI ASC-US DA CAMPIONE DI URINE E PRELIEVO CERVICALE

Zhou X., Lunghi G., Mascheroni E., Orlandi A., Zoccoli A.,* Moijana G., Torresani E.

Laboratorio di Virologia, *Servizio di Ginecologia Preventiva- Fondazione IRCCS Policlinico, Ma.Re.

Introduzione.

L'infezione da Human Papillomavirus (HPV) è una delle più frequenti cause di malattia a trasmissione sessuale, in entrambi i sessi e in tutto il mondo. Sono stati riconosciuti più di 200 tipi di HPV, di cui almeno 35 infettanti primariamente il tratto genitale e responsabili di patologie benigne, quali il condiloma ano-genitale, o maligne, quali il carcinoma della cervice uterina. In base alla associazione dei diversi genotipi con la genesi del carcinoma della cervice sono stati definiti a basso (6-11-42-43-44) ed ad alto rischio (16-18-31). Il notevole sviluppo delle metodiche di biologia molecolare ha consentito recentemente ai laboratori di virologia clinica di rendere operativi algoritmi diagnostici per HPV e di valutare parimenti l'utilizzo di campioni alternativi al prelievo cervicale.

Metodi.

Nel nostro studio abbiamo valutato 98 campioni di urina e di materiale cervicale provenienti da altrettante pazienti con diagnosi citologica di ASC-US (Cellule Squamose Atipiche di significato Indeterminato). Per il test di screening è stato utilizzato il kit Amplicor HPV Roche che consente di amplificare il DNA di HPV proveniente da 13 sottotipi ad alto rischio, mentre per la rilevazione dei genotipi specifici è stato utilizzato kit Linear Array genotyping test Roche.

Risultati.

L'84,7% dei campioni di urine e prelievo cervicale ha

presentato risultato concordante (52.9% positivo e 31.8% negativo). Il 15.3% dei casi ha invece evidenziato risultato discordante ed in particolare 10.2% ha presentato positività al solo campione di urine e il 5.1% al solo prelievo cervicale.

Conclusioni.

Da questi dati preliminari sembrerebbe che la determinazione di HPV sulle urine potrebbe validamente candidarsi come test sostitutivo al prelievo cervicale, rendendo più semplice la raccolta per lo screening dei soggetti a rischio. Inoltre l'utilizzo di tale campione consentirebbe di indagare in modo semplice l'eventuale coinvolgimento di HPV nell'insorgenza di patologie prostatiche.

CO4.2

FOLLOW-UP DELLE PAZIENTI CONIZZATE E IMPORTANZA DEL TEST HPV

Venturi C., Parrillo M.G., Forese F., Papucci A., Apicella P., Bianchi L.

U.O. Anatomia Patologica, Ospedale "SS Cosma e Damiano", ASL 3 Pistoia, Zona della Val di Nievole, Via Cesare Battisti 2, 51017 Pescia (PT).

Introduzione.

L'infezione persistente della cervice uterina da parte di ceppi HPV ad alto rischio oncogeno (HR-HPV:16, 18, 31, 33) ha un ruolo predominante nella patogenesi del cancro preinvasivo ed invasivo della cervice.

Uno dei trattamenti riconosciuti della neoplasia intraepiteliale cervicale è la conizzazione. Obiettivo.Scopo di questo studio è valutare se il test HPV permette di discriminare le pazienti che hanno un rischio maggiore di recidive dopo trattamento delle lesioni intraepiteliali di alto grado.

Metodi.

162 pazienti che presentavano displasia moderata o grave all'esame istologico su biopsia cervicale hanno eseguito il test HPV su prelievo endocervicale effettuato con Thin-Prep (Ditta Cytec) prima della conizzazione e solo 47 hanno ripetuto il test HPV 6-12 mesi dopo la conizzazione. Per la rilevazione dell'HPV si utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) con primers specifici per la regione L1 (Ditta Diatech) con impiego degli enzimi di restrizione e primers specifici per la regione E6 ed E7 (Ditta Experteam).

Risultati.

- 1) HPV ad alto rischio è stato identificato in tutte le 162 pazienti prima della conizzazione;
- 2) nella nostra casistica solo il 29% (47/162) ha eseguito il test HPV 6-12 mesi dalla conizzazione;
- 3) l'83% (39/47) presentava eradicazione in seguito a conizzazione e 11% (5/47) presentavano una recidiva con persistenza di HR-HPV di cui 4 con margini di resezione positivi.

Conclusioni.

I dati di questo studio confermano:

- 1) la forte correlazione fra HR-HPV e lesioni precancerose e cancerose cito-istologiche;
- 2) l'eliminazione con successo dell'infezione di HR-HPV nella maggior parte dei casi trattati;
- 3) la persistenza di HR-HPV dopo conizzazione e correlazione diretta con la positività dei margini di resezione e ripresa della malattia.

Quindi il test HPV è utile nel monitorare i risultati terapeutici della conizzazione e discriminare i pazienti che hanno un alto rischio di recidive di malattia.

CO4.3

PREVALENZA DI INFEZIONI GENITALI ERPETICHE IN UNA COORTE DI IMMUNOCOMPETENTI NEGLI ANNI 2004-2005

Ventola C., Calvario A., Satalino M., Scarasciulli M.L., Bozzi A.

U.O. Igiene II - Lab.Virologia Diretta
- Policlinico Bari P.zza G.Cesare, 11 - 70124 Bari - Italia

Introduzione.

L'accresciuto interesse verso le infezioni genitali da HSV1 e HSV2 è correlato all'aumento della prevalenza della malattia, probabilmente dovuto sia a modifiche nelle pratiche sessuali che all'utilizzo di accurati test diagnostici tipo-specifici. Alla diffusione del virus contribuisce una diagnosi non corretta basata esclusivamente sull'esame clinico, lo shedding asintomatico e l'elevata frequenza di forme atipiche; quindi la trasmissione può avvenire a seguito di episodi asintomatici o sintomatici non riconosciuti.

Particolare interesse desta la trasmissione virale in coppie discordanti (donna negativa /partner positivo per HSV) data l'alta probabilità di infezione primaria nel periodo gravidico, principale fattore di rischio di HSV neonatale.

Materiali e metodi.

Nel biennio 2004-2005, dei 101 pazienti analizzati 55 presentavano una diagnosi di sospetta infezione da HSV1/2, 18 erano in regime fivet e 28 erano gestanti con o senza sintomatologia. Il campionamento prevedeva tamponi vaginali e/o cervicali, uretrali e anali, a volte associati a campioni di siero e/o PBLs. Il liquido amniotico è stato analizzato in 9 casi di gravidanza a rischio. I campioni sono stati testati con metodiche Real Time, nested PCR (Nanogen Advanced Diagnostics) e, relativamente ai tamponi, anche con isolamento culturale su MRC5.

Risultati.

Dei 55 pazienti con sospetta infezione da HSV1/2, il 10,9% risultava positivo per HSV1, il 16,4% per HSV2, l'3,6% per HSV1/2. Dei 18 pazienti in regime fivet l'11,1% risultava positivo per HSV1.

Tra le 28 gestanti (7-32 settimane), una risultava HSV1 positiva nel tampone e HSV2 nell'amnios (20 settimana) e 4 HSV2 positive nel tampone vaginale, associato in un caso ad amnios positivo. In un solo caso è stato eseguito il follow-up nel neonato.

Discussione.

L'incremento delle infezioni genitali da HSV pone il problema di come gestirle. Dal nostro studio si evince una scarsa attenzione clinica alla corretto management della problematica che può evolvere in forme severe in caso di complicanze sistemiche o gravidanza.

CO4.4

CONFRONTO TRA DUE METODI PER LA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI PAPILLOMAVIRUS GENITALI

Nicosia A.M., Ravanini P., Crobu M.G., Cagliano M., Caroppo M. S., Crespi I.

Azienda "Ospedale Maggiore della Carità"
Novara - Laboratorio Microbiologia e Virologia

Introduzione. I papillomavirus genitali vengono suddivisi in genotipi ad alto, medio e basso rischio oncogeno. Alcuni tests molecolari permettono la distinzione in genotipi a basso ed alto rischio. Altri tests permettono invece una definizione più precisa dei genotipi.

Metodi. In questo studio abbiamo confrontato due metodi di tipizzazione. Sono stati tipizzati 23 campioni cervicali, utilizzando i metodi: Inno-LiPA HPV Genotyping (Innogenetics), che permette la tipizzazione di 24 genotipi, e Linear Array HPV Genotyping Test (Roche) che permette la rivelazione di 37 genotipi.

Risultati e conclusioni. I campioni hanno dimostrato la presenza di molti differenti genotipi e in 13 campioni su 23 la presenza di coinfezioni.

Confrontando i risultati ottenuti, indipendentemente dalle possibilità di tipizzazione dei due tests, notiamo una concordanza totale del 35% (8/23), una discordanza parziale del 35% (8/23) e una discordanza totale del 30% (7/23). Considerando però la differente capacità discriminatoria dei tests, la concordanza risulta del 74% (17/23), la discordanza parziale del 17% (4/23) e la discordanza totale del 9% (2/23). I casi con maggiore discordanza riguardano i genotipi 42, 56, 59.

Considerando solo il dato del rischio oncogeno, la concordanza è stata del 78% (18/23) e la discordanza del 22% (5/23). I campioni discordanti sono dovuti in 4 casi (17%) a campioni non tipizzabili con Inno-LiPA, e risultati invece tipizzabili con Linear Array che prevede la presenza delle sonde specifiche per i genotipi evidenziati (55, 61, 62, 84, CP6108), tutti a basso rischio. Solo in un caso vi è stata la rivelazione di un basso rischio con Linear Array (genotipo 61) e di un alto rischio con Inno-LiPA (genotipo 56).

Il test Linear Array è risultato più sensibile del test Inno-LiPA, permettendo la rivelazione dei genotipi virali anche dei 4 campioni non tipizzabili (sensibilità: 100% per Linear Array; 83% per Inno-LiPA). Linear Array ha anche rivelato genotipi supplementari rispetto al test Inno-LiPA, nel caso di campioni con coinfezioni (6 casi: 26%). Negli altri campioni la concordanza tra i tests è buona, pur dimostrando alcune differenze che hanno condotto in un caso ad un risultato differente rispetto al rischio oncogeno.

comunicazioni orali

SESSIONE 5

La diagnostica molecolare in batteriologia: attualità e prospettive

Mercoledì 20 Settembre 2006, ore 09.00-13.00, Sala GIALLA

CO5.1

DIAGNOSI RAPIDA DI SEPSI: RISULTATI DELLA VALUTAZIONE DEL TEST LIGHTCYCLER® SEPTIFAST

Raglio A.¹, Rizzi M.², Amer M.³, Mangia M.⁴, Lucà MG.⁵, Fiorina L.¹, Goglio A.¹

¹Microbiologia e Virologia, ²Malattie Infettive, ³Terapia Intensiva, ⁴Medicina Interna, ⁵Gastroenterologia, AO Ospedali Riuniti, Bergamo

Introduzione.

È oggi disponibile un metodo in Real-Time PCR (LightCycler SeptiFast, Roche Diagnostics) che consente l'identificazione dei 25 principali microrganismi responsabili di sepsi (gram+, gram- e funghi). Il nostro laboratorio ha partecipato a diversi studi multicentrici europei tra i quali lo studio beta i cui risultati globali hanno portato alla marcatura CE del test. Riportiamo i nostri risultati.

Metodi.

I campioni per il test in PCR (LightCycler® SeptiFast) sono stati raccolti contemporaneamente ai campioni prelevati per l'esame emoculturale (BC) in pazienti con SIRS. Per ogni paziente sono stati raccolti i dati clinici e di laboratorio ed i risultati microbiologici di altri campioni.

BC è stato eseguito con il sistema BactAlert (BioMerieux). LightCycler® SeptiFast è stato eseguito sullo strumento LightCycler 2.0 CE-IVD (Roche Diagnostics) previa estrazione dell'acido nucleico a partire da 3 mL di sangue K-EDTA. Il test ha una durata di 6 ore, a partire dal campione di sangue. I risultati sono stati valutati insieme ai clinici sulla base dei dati clinici, microbiologici (su campioni diversi da sangue) e di laboratorio.

Risultati.

Sono stati esaminati 214 campioni raccolti da 101 pazienti. 162 campioni sono risultati negativi in BC e in SeptiFast. Il tasso di positività per BC è stato del

9.8% e per la SeptiFast del 21.5%:

Dei 21 risultati positivi in emocoltura il 71% concordevano con SeptiFast, il 14% erano contaminanti e il 14% erano positivi solo con BC clinicamente significativi (2 *S. pneumoniae* e 1 *C. albicans*).

Dei 46 risultati positivi con LightCycler SeptiFast il 74% sono stati confermati con altri test (32% con BC, 41% con altri test microbiologici). In particolare SeptiFast ha permesso la diagnosi eziologica in 6 pazienti: polmonite da *S. pneumoniae*, peritonite da CoNS, epatocolangite da *E. coli* e da *K. pneumoniae/oxytoca*, polmonite da *P. aeruginosa*, batteriemia catetere correlata da CoNS, polmonite da *A. fumigatus*.

Per il 26% dei risultati positivi non è stato possibile nell'ambito dello studio arrivare a definire un ruolo eziologico.

Conclusioni.

I nostri dati confermano la rapidità (identificazione dei patogeni in 16 - 40 ore in relazione all'organizzazione di laboratorio) e la maggior sensibilità di SeptiFast rispetto a BC (con un tasso di positività doppio) rispetto a BC. I risultati, come per l'emocoltura, devono sempre essere letti criticamente tenendo conto di tutti i dati del paziente e dell'epidemiologia batterica dei reparti.

CO5.2

TIPIZZAZIONE DI CEPPI DI LEGIONELLA CLINICI ED AMBIENTALI CON TECNICHE MOLECOLARI (PFGE, RAPD E SBT)

Franzin L.

Laboratorio "Ricerca Speciale Microbiologica", Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, Ospedale Amedeo di Savoia, Corso Svizzera 164, 10149 Torino.

Introduzione.

La trasmissione dell'infezione da *Legionella* avviene

in genere mediante inalazione di aerosol contaminato. Trattandosi di batterio acquatico ubiquitario con serbatoio ambientale, la tipizzazione molecolare dei ceppi di *Legionella* isolati dal paziente e dall'ambiente è fondamentale in quanto permette di stabilire la relazione di clonalità dei ceppi epidemiologicamente correlati e di riconoscere la sorgente di infezione. In questo lavoro viene presentata l'utilità delle tecniche molecolari nello studio di 7 episodi di legionellosi.

Metodi.

I ceppi clinici ed ambientali sono stati isolati con procedure adottate nel nostro Laboratorio dal 1983, mediante l'uso combinato di vari terreni (BCYE, BMPA e MWY) e di diversi trattamenti (acidi, calore). I ceppi sono stati tipizzati con metodi sierologici; gli isolati di *L. pneumophila* sierogruppo 1 sono stati anche tipizzati con anticorpi monoclonali (MAb). I ceppi clinici e ambientali correlati isolati in 5 episodi di infezione nosocomiale e in 2 comunitari sono stati esaminati con PFGE (pulsed field gel electrophoresis), con RAPD-PCR (random primers amplified polymorphic DNA), con sequenziamento del gene *mip* o con SBT (sequence-based typing) secondo il metodo EWGLI.

Risultati.

In tutti i casi esaminati i ceppi isolati dal paziente e quelli ambientali correlati presentavano lo stesso profilo con le tecniche molecolari, mentre risultavano differenti rispetto a quelli non correlati. Le tecniche utilizzate, pur con diverso grado di potere discriminante e di sensibilità, sono risultate utili allo scopo. La combinazione con la tipizzazione con MAb ha fornito risultati ottimali.

Conclusione.

La tipizzazione genomica dei ceppi ha consentito di riconoscere in maniera inequivocabile la sorgente di infezione nei 7 episodi studiati. Si ribadisce ancora l'importanza della ricerca colturale dai campioni clinici; la disponibilità dei ceppi clinici ed ambientali consente infatti la loro tipizzazione con tecniche molecolari, che si sono mostrate di grande utilità ai fini epidemiologici per il riconoscimento della sorgente di infezione.

CO5.3

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI MICOBATTERI: "INNO-LIPA" E SEQUENZIAMENTO A CONFRONTO

Morelli S.; Pignatelli S.; Torsani E.*; Pignatelli S.*; Dal Monte P.; Sambri V.; Nanetti A.

DMCSS, sez. Microbiologia, Via Massarenti 9,
40138, Bologna,

*Specializzandi Scuola Spec. Microbiologia e Virologia,
UNIBO.

Introduzione.

L'elevato incremento delle infezioni da *M.tuberculosis*

complex e la comparsa di micobatteri non tubercolari *MOTT*, ha reso necessario introdurre nella routine diagnostica l'utilizzo di tecnologie molecolari, sia per ridurre i tempi di refertazione, che per giungere ad una identificazione inequivocabile.

Materiali e metodi.

A tale scopo è stato introdotto nel nostro laboratorio INNO-Lipa MYCOBACTERIA v-2 (ditta INNOGENETICS) che prevede l'amplificazione del DNA del micobatterio in corrispondenza della regione spaziatrice 16S-23S del gene che codifica per l'RNA ribosomiale (rRNA) e successiva ibridazione con sonde a sequenza specifica per l'identificazione del genere *Mycobacterium* e 16 diverse specie nell'ambito dello stesso genere.

Tuttavia, nel 16,5% dei casi non è stato possibile identificare la specie micobatterica.

A partire da gennaio 2005 abbiamo quindi estratto e conservato il DNA dei micobatteri da noi isolati. Su 50 micobatteri atipici isolati, in 8 casi non è stato possibile ottenere l'identificazione. Abbiamo pertanto valutato l'utilità di un saggio PCR "home-made" (Heekyung *et al*, J.Clin Microb., 2000; 38:4080-4085), mediante amplificazione della sequenza spaziatrice 16S-23S (ITS), successivo sequenziamento e confronto con le sequenze depositate in GenBank.

Risultati.

Nel corso dello studio abbiamo sequenziato 12 campioni precedentemente tipizzati (4 *Myc.tuberculosis* 2 *Myc.avium*; 1 *Myc.kansasii*; 1 *Myc.xenopi*; 1 *Myc.genevense*; 2 *Myc.chelonae*, 1 *Myc.gordonae*) e 8 campioni non identificati dal sistema INNO-Lipa. Delle 12 sequenze di micobatteri già noti, abbiamo ottenuto una concordanza del 100%. Tra gli 8 isolati non identificati, le sequenze sono state attribuite ai seguenti micobatteri: 1 *Myc.avium complex*, 2 *Myc.mucogenicum*; 3 *Myc.arupense*, 1 *Myc.gallinarum* e in un solo caso non è stato possibile assegnare la specie.

Conclusioni.

In definitiva quindi il sequenziamento può permettere un'identificazione sicura e accurata delle varie specie di micobatteri utile non solo ai fini epidemiologici, ma anche clinici. Inoltre non va sottovalutato che il sequenziamento è decisamente più economico rispetto al test INNO-Lipa.

comunicazioni orali

SESSIONE 6

MRSA: da patogeno ospedaliero a patogeno comunitario

Mercoledì 20 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, Sala BERLINO

CO6.1

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ISOLATI CLINICI DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS DI PROVENIENZA RESPIRATORIA

**Corsi E.¹, Meacci F.², Brignali S.², Trappetti A.²,
Oggioni M.R.³, Alegente G.¹ and Pozzi G.²**

¹U.O. Microbiologia,

Azienda Ospedaliera Universitaria Senese,
viale Bracci, 53100 Siena;

²LAMMB, Dip. di Biologia Molecolare,
Università degli Studi di Siena, viale Bracci, 53100 Siena.

³UOC Batteriologia,

Azienda Ospedaliera Universitaria Senese,
viale Bracci, 53100 Siena.

Introduzione.

La resistenza multipla in *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) è un problema di crescente importanza. Nonostante la vancomicina rappresenti la terapia di scelta nel trattamento delle infezioni sostenute da MRSA, a causa della sua scarsa diffusione ai tessuti e della sua moderata attività battericida, nel trattamento delle infezioni profonde è spesso associata a rifampicina. La rifampicina inoltre, in combinazione con i fluorochinoloni, rappresenta una strategia alternativa per la prevenzione della emergenza di mutanti resistenti nel trattamento di infezioni gravi da *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibile (MSSA). Scopo del presente lavoro è la caratterizzazione molecolare di una collezione di MRSA e MSSA, isolati a Siena nel triennio 2003-2006.

Metodi.

84 MRSA e 85 MSSA, isolati presso l'U.O. di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Senese nel triennio 2003-2006, di provenienza prevalentemente respiratoria, sono stati saggiati per la loro

sensibilità ai chemioterapici mediante determinazione della MIC. Il sequenziamento di una regione di 460 bp del gene *rpoB* ha permesso la caratterizzazione delle mutazioni presenti nei ceppi rifampicina-resistenti.

Risultati.

Il fenotipo di resistenza alla rifampicina è presente in 39/84 (46,4%) MRSA e in 2/85 (2,33%) dei MSSA. In 20 ceppi MRSA resistenti alla rifampicina, l'analisi delle mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina ha messo in evidenza la mutazione His→Asn nel codone 481 del gene *rpoB*.

Conclusioni.

L'analisi delle mutazioni del gene *rpoB* ha permesso la caratterizzazione molecolare della resistenza alla rifampicina in 169 isolati clinici di *Staphylococcus aureus*.

CO6.2

INDAGINE SULLA DIFFUSIONE DI STAFILOCOCCI RESISTENTI ALLA METICILLINA IN LIGURIA

**Maioli E., Andreotti M., Annovazzi G.,
Bandettini R., Battolla E., Bona R.,
Borreanaz T., Bottaro L.C., Brunetti R.,
Capuzzo R., Devoto G.L., Dono M.,
Dusi A., Fedele M., Ferro G., Giusto G.R.,
Graziani A., Intra E., Lacitignola G.,
Mannelli S., Marangoni M., Massucco F.,
Mazzarello M.G., Mori M., Perfumo M.,
Pescetto L., Piatti G., Reali S., Ricagni L.,
Ronca A., Santoriello L., Serra D., Usiglio D.,
Marchese A., Debbia E.A.**

Gruppo Ligure sulla meticillino-resistenza,

Sezione di Microbiologia - DISCAT, Università di Genova

Introduzione Gli stafilococchi sono importanti opportunisti gram-positivi nosocomiali. La meticillino-resi-

stenza ha reso questi patogeni refrattari a tutti i β -lattamici, espandendosi dalle aree ospedaliere alla comunità. In questo studio è stata fotografata la situazione ligure sugli stafilococchi resistenti alla meticillina

Materiali e metodi. Sono stati raccolti 767 ceppi di *Staphylococcus* spp. da 10 laboratori liguri, così suddivisi: 508 *S. aureus* (292 (57.5%) nosocomiali, 188 (37%) comunitari, 28 (5.5%) case di riposo); 259 stafilococchi coagulasi negativi (193 (74.5%) nosocomiali, 56 (21.6%) comunitari 10 (3.9%) case di riposo. I saggi sono stati eseguiti mediante la tecnica di diffusione da dischetto CLSI (2005) utilizzando oxacillina (OXA) e cefoxitin (CFX) (Oxoid, Milano). MRSA è stata confermata mediante di PBP2' su 52 ceppi di *S. aureus* casuali con test di agglutinazione al lattice (Oxoid).

Risultati I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella e hanno dimostrato tra centri di origine dei ceppi e il laboratorio di riferimento una concordanza del 99%.

	N° ceppi (%)	Oxacillina-R (%)	Cefoxitina-R (%)
<i>Staphylococcus</i>	767	328(42.8%)	352(45.9%)
Nosocomiali	485(63.2%)	283(58.3%)	300(61.8%)
Comunitari	244(31.8%)	22(9%)	26(10.6%)
Case di riposo	38(5%)	23(60.5%)	26(68.4%)
<i>S. aureus</i>	508(66.2%)	149(29.3%)	161(31.7%)
Nosocomiali	292(57.5%)	124(42.5%)	132(45.2%)
Comunitari	188(37%)	10(3.5%)	12(6.4%)
Case di riposo	28(5.5%)	15(53.6%)	17(60.7%)
<i>S. coag. neg.</i>	259(33.8%)	179(69.1%)	191(73.7%)
Nosocomiali	193(74.5%)	159(82.4%)	168(87%)
Comunitari	56(21.6%)	12(21.4%)	14(25%)
Case di riposo	10(3.9%)	8(80%)	9(90%)

Il test di agglutinazione (PBP2') è risultato concordante con i ceppi MRSA identificati con le metodiche usuali.

Conclusioni. Queste osservazioni indicano una iniziale diffusione di MRSA che richiederà una conferma a carattere molecolare e la necessità di ripetere tali controlli periodicamente.

comunicazioni orali

SESSIONE 7

La Biologia Molecolare in microbiologia: stato dell'arte

Giovedì 21 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

CO7.1

REAL-TIME PCR E *DIENTAMOEBIA FRAGILIS*: UN APPROCCIO MOLECOLARE ALLA DIAGNOSI PARASSITOLOGICA.

De Canale E.¹, Biasolo M.A.^{1,2}, Tessari A.¹, Mengoli C.^{1,2}, Palu' G.^{1,2}.

¹Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova.

²Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova.

Introduzione.

Dientamoeba fragilis è un protozoo intestinale che negli ultimi anni ha suscitato un interesse crescente. Diversi autori hanno associato la presenza di questo protozoo a numerosi sintomi prevalentemente a carico dell'apparato gastrointestinale, anche se è stata riportata la presenza di portatori asintomatici. L'esecuzione dell'esame copro-parassitologico per l'identificazione di *Dientamoeba fragilis* richiede la presenza di un parassitologo esperto, appositamente addestrato al riconoscimento del trofozoita mediante analisi microscopica. In questo lavoro abbiamo valutato una nuova tecnica molecolare in Real-Time PCR per la rilevazione di questo parassita.

Metodi.

lo studio ha coinvolto 26 pazienti afferiti all'U.O. di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova nel corso dell'anno 2004 e risultati positivi alla ricerca di *Dientamoeba fragilis* mediante l'utilizzo dei tradizionali approcci diagnostici. Trentotto volontari sani arruolati tra gli studenti di medicina dell'università di Padova e loro congiunti sono stati considerati come controllo. I due gruppi sono stati riesaminati con una metodica originale in Real-Time PCR (TaqMan) utilizzando un singolo campione di feci per ciascun soggetto, analogamente ad un'inchiesta epidemiologica. Sul medesimo campione di feci è stato inoltre con-

dotto un esame microscopico diretto, uno dopo colorazioni permanenti e un test in PCR convenzionale.

Risultati.

nella tabella seguente sono illustrate la sensibilità e la specificità della microscopia tradizionale e delle metodiche molecolari in TaqMan e in PCR convenzionale su gel.

	Microscopia diretta su feci fissate	Microscopia su colorazione Tricromica	Microscopia su colorazione di Giemsa	PCR convenzionale su gel	Real-time TaqMan PCR
Sensibilità	92,3% (24/26)	92,3% (24/26)	42,3% (11/26)	73,1% (19/26)	100% (26/26)
Specificità	100% (38/38)	100% (38/38)	100% (38/38)	100% (38/38)	100% (38/38)

Conclusioni.

Le indagini mediante la microscopia ottica presentano performance accettabili ai fini diagnostici, tuttavia la Real-Time TaqMan PCR ha dimostrato una superiore capacità di rivelare la presenza di *Dientamoeba fragilis* rispetto alle tradizionali tecniche microscopiche e alla PCR su gel. L'alto livello di sensibilità e specificità della metodica riscontrati in questo studio potrebbe rendere sufficiente il prelievo di un unico campione di feci, per il rilevamento del protozoo, con una riduzione dei costi ed evitando di manipolare sostanze ritenute tossiche nel corso dell'esecuzione delle colorazioni permanenti.

CO7.2

VALUTAZIONE DELLE MUTAZIONI DI RESISTENZA AGLI ANTIVIRALI NEI SOGGETTI IN TRATTAMENTO PER INFEZIONE CRONICA DA HBV: MUTAZIONI SECONDARIE INDOTTE DA LAMIVUDINA POSSONO INFLUIRE SUI SUCCESSIVI TRATTAMENTI

Crobu M.G., Ravanini P., Nicosia A.M., Grossini E., Cagliano M., Kroumova V., Di Natale C., Fortina G.

Azienda "Ospedale Maggiore della Carità"

- Novara - Laboratorio Microbiologia e Virologia

Introduzione.

Il virus dell'epatite B è causa di un elevato numero di

epatiti croniche che vengono trattate con terapie a base di farmaci antivirali, quali Lamivudina, Adefovir, Entecavir. Il trattamento con questi farmaci porta spesso all'insorgenza di varianti resistenti, che possono essere messe in evidenza con metodi di sequenziamento del gene P.

Metodi e risultati.

Riportiamo i dati relativi al monitoraggio del trattamento di 90 pazienti in terapia con Lamivudina o Adefovir per un periodo di due anni.

Nel caso delle resistenze a Lamivudina, dopo due anni, il 58% dei pazienti (52 casi) non dimostrava la presenza di mutazioni di resistenza. Invece in 12 casi (13%) è risultata presente la singola mutazione M204I; in 8 casi (9%) le due mutazioni M204I e L180M; in 16 casi (18%) le due mutazioni M204V e L180M; e in 2 casi (2%) le tre mutazioni M204I, L180M, V173L.

Solo 4 di questi 90 pazienti sono stati trattati anche con Adefovir per almeno due anni. Tra questi, solo un caso è risultato positivo per le due mutazioni A181V e N236T. Interessanti però sono i dati relativi alla comparsa di altre mutazioni, in corso di terapia con Lamivudina, e che potenzialmente possono pregiudicare i successivi eventuali trattamenti con altri farmaci antivirali.

In 13 casi su 90 (14%) sono comparse le mutazioni A181S (1 caso), Q215S (10 casi), V214A (1 caso) e I233V (1 caso). Queste mutazioni possono essere responsabili di resistenza ad Adefovir.

In 9 casi su 90 (10%) sono comparse le mutazioni M250L (3 casi), M250V (1 caso), T184S (4 casi) e T184I (1 caso). Queste mutazioni possono essere responsabili di resistenza ad Entecavir.

Conclusioni.

Questi dati ci indicano come la valutazione complessiva del pannello di resistenza sia importante per indirizzare una corretta scelta clinica della terapia da utilizzare in caso di fallimento del primo trattamento. La rilevazione di tutte queste mutazioni dovrebbe essere quindi inclusa nei sistemi diagnostici in uso, e i metodi di sequenziamento appaiono i più adatti ad una implementazione di questo tipo senza influire su un aumento dei costi o dei tempi operativi.

nali, si sono dimostrati utili durante 5 anni di applicazione alla diagnosi di laboratorio di parassitosi causate da protozoi.

Metodi.

Sono stati applicati per la ricerca del DNA di protozoi i seguenti metodi: PCR e/o nested PCR convenzionale, Real-time PCR (TaqMan; FRET).

Risultati.

Diagnosi di amebiasi. Solo grazie ai metodi molecolari (PCR convenzionale e Real-time PCR chimica FRET), è stata correttamente rilevata la prevalenza di casi di amebiasi (infezione da *E. histolytica* 0,6%) e dei casi di infezione da *E. dispar* (0,8%). I metodi diagnostici tradizionali (esame microscopico e colturale) non consentono la differenziazione dei casi di amebiasi dai casi di infezione da *E. dispar* (non patogena).

Diagnosi di malaria. La diagnosi di malaria mediante esame microscopico è affiancata, nel nostro laboratorio, da nested PCR e/o Real-time PCR. I metodi molecolari si sono rivelati sensibili, specifici (rivelando infezioni miste), rapidi, di semplice esecuzione ed automatizzati (Real-time PCR). I risultati ottenuti hanno dimostrato la seguente prevalenza: *P. falciparum* 80% (esame microscopico 78%), *P. vivax* 2% (esame microscopico 5,4%), *P. ovale* 9,2% (esame microscopico 6,8%), *P. malariae* 2% (esame microscopico 0%), infezioni miste (causate da 2 o più plasmodi) 6,5% (esame microscopico 1,3%), *Plasmodium spp.* 0% (esame microscopico 5,4%).

Diagnosi di toxoplasmosi. La diagnosi di toxoplasmosi mediante metodi molecolari [PCR convenzionale, Real-time PCR (Taqman e FRET)] si è rivelata indispensabile in un caso di infezione cerebrale in un paziente immunodepresso e per escludere l'infezione in casi di sospetta toxoplasmosi congenita.

Diagnosi di leishmaniosi. Soltanto il saggio Real-time PCR (FRET) ha permesso di diagnosticare 1 caso di leishmaniosi viscerale non rivelata dal metodo colturale e di escludere la diagnosi in casi sospetti (59).

Conclusioni.

L'applicazione dei metodi molecolari ha notevolmente migliorato l'accuratezza della diagnosi di infezione da questi protozoi consentendoci anche di valutare la corretta prevalenza delle rispettive parassitosi nella nostra realtà.

CO7.3

LA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSTICA PARASSITOLOGICA

Calderaro A., Gorrini C., Piccolo G., Peruzzi S., Bommezzadri S., Dettori G., Chezzi C.

*Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio,
Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma.*

Introduzione.

Diversi metodi molecolari, affiancati a quelli tradizio-

comunicazioni orali

SESSIONE 9

Il ruolo della diagnostica microbiologica nell'attività di trapianto e per la sicurezza trasfusionale

Venerdì 22 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

CO9.1

INFEZIONE DA METAPNEUMOVIRUS IN SOGGETTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

Debiaggi M.¹, Canducci F.^{2,3}, Sampaolo M.^{2,3}, Marinozzi M.C.^{2,3}, Parea M.⁴, Terulla C.⁴, Colombo A.A.⁵, Alessandrino E.P.⁵, Arghittu M.⁶, Goglio A.⁷, Migliavacca R.¹, Romero E.^{1,4}, Clementi M.^{2,3}

¹Dip. S.M.E.C. Sez. Microbiologia, Univ. di Pavia, via B. rambilla, 74, Pavia

²Lab. di Micr. e Virol., I.R.C.C.S. e

³Univ. Vita-Salute San Raffaele, via Olgettina, 58, Milano

⁴Serv. Analisi Microb. e 5Div. Ematologia, I.R.C.C.S. Pol. S. Matteo, p.le Golgi, 2, Pavia

⁶A.O. di Melegnano, via Pandina, 1, Vizzolo Predabissi, Milano

⁷U.S. Micr. e Virol., A.O. Ospedali Riuniti, Largo Barozzi, 1, Bergamo.

Introduzione.

Metapneumovirus umano (hMPV), associato a infezioni respiratorie in età pediatrica, è stato isolato anche in soggetti adulti, in particolare immunocompromessi. Per valutarne il ruolo patogeno in questi soggetti è stato condotto uno studio prospettico in pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT).

Metodi.

Da ottobre 2004 a ottobre 2005 si sono esaminati campioni di aspirato nasofaringeo (NPA) ottenuti, indipendentemente dalla presenza di sintomatologia respiratoria, da soggetti HSCT; i campioni, prelevati a differenti tempi dal trapianto, sono stati esaminati per la presenza di hMPV mediante RT-PCR. Parallelamente si sono esaminati campioni di NPA ottenuti da pazienti pediatrici sintomatici. I campioni sono stati tipizzati

mediante sequenziamento delle regioni amplificate.

Risultati.

Si sono valutati 107 campioni ottenuti da 21 pazienti HSCT e 244 campioni ottenuti da 244 pazienti pediatrici. MPV-RNA è stato rilevato in 53 dei 107 NPA (49.5%) ottenuti da 18 pazienti HSCT (85.7%). Dei campioni positivi, 6 sono stati raccolti all'ingresso del paziente in ospedale, 12 durante il regime di condizionamento e 35 da 15 giorni a 3 mesi dopo il trapianto. La presenza di MPV-RNA veniva persistentemente rilevata per periodi da 26 a 94 giorni senza differenze nella distribuzione stagionale ed in assenza di segni o sintomi respiratori specifici. Nei pazienti pediatrici 37 dei 244 campioni (15.1%) risultavano positivi, con un picco di prevalenza in gennaio e febbraio. L'analisi di sequenza ha evidenziato genotipo A e marcata omologia di sequenza in tutti i campioni dei pazienti HSCT e la presenza di entrambi i genotipi (A e B) nei pazienti pediatrici.

Conclusioni.

Questo studio documenta un'alta prevalenza e persistenza di infezione asintomatica da hMPV in pazienti HSCT e sottolinea l'importanza di ulteriori studi sul ruolo della risposta immunitaria antivirale nella patogenesi della malattia.

CO9.2

IL DOSAGGIO DEL GALATTOMANNANO NEL LAVAGGIO BRONCO-ALVEOLARE PER LA DIAGNOSI DELLE INFEZIONI DA ASPERGILLO

Barbui A., Catalano A., Lo Monaco M.S., Marchiaro G.

SC Microbiologia, Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista, Corso Bramante 88, 10126 Torino

Introduzione.

L'aspergillosi invasiva rappresenta un'infezione

opportunistica ad elevata mortalità in pazienti immunocompromessi con neutropenia prolungata. La sua incidenza risulta in aumento ed il successo della terapia è condizionato dalla diagnosi precoce.

L'aspergillosi polmonare invasiva (IPA) presenta un difficile e complesso approccio diagnostico e terapeutico poiché gli aspergilli possono colonizzare l'ospite senza essere causa di patologia. La diagnosi di laboratorio viene effettuata tradizionalmente con l'esame colturale su campioni respiratori e con la ricerca di antigeni specifici nel siero (galattomannano) con metodo rapido immunoenzimatico.

Il galattomannano è abbondantemente rilasciato durante la crescita del micete ed è presente a livello alveolare nei primissimi stadi dell'infezione.

Metodi.

Lo scopo di questo lavoro è stato e la valutazione dell'utilità diagnostica del dosaggio del galattomannano nel BAL. Sono stati analizzati 282 BAL (220 pazienti) sui quali sono stati eseguiti l'esame colturale e la ricerca del galattomannano (ASA) mediante metodica ELISA (Platelia Aspergillus, BIORAD) e 110 campioni di siero nei quali è stato dosato il galattomannano.

Risultati.

I risultati sono stati i seguenti: ASA-BAL: 224 negativi con index < 1.5 (182 pazienti) e 58 positivi con index: 1.7-20.0 (36 pazienti), coltura per Aspergillus spp: 245 negativi e 37 positivi, ASA-siero: 99 negativi (index <1,5) e 11 positivi (index: 1.6-8.9).

Tutti i 224 campioni di ASA-BAL-negativi sono risultati negativi per Aspergillus spp alla coltura, nessuno dei pazienti mostrava segni radiologici e clinici di infezione invasiva e tutti i 76 dosaggi eseguiti su siero erano negativi. Tra i 58 ASA-BAL-positivi: 36 (62%) erano positivi alla coltura e 22 (38%) erano negativi. Il dosaggio su siero è stato possibile per 34 campioni, dei quali 11 positivi. Nei BAL con valori di index inferiori a 4.0 non si sono avute colture positive mentre valori di index superiori a 6.0 sono sempre stati confermati da una coltura positiva, ad eccezione di un caso di IPA accertata con coltura negativa e ASA positivo su BAL e siero. Nei 36 pazienti ASA-BAL-positivi sono stati identificati 25 casi di aspergillosi invasiva (8 accertata, 2 probabile e 15 possibile secondo i criteri dell'EOTCC). Il valore predittivo negativo del test risulta essere del 100% con un buon valore predittivo positivo (superiore al 70%) per i pazienti ad alto rischio.

Conclusioni.

Pertanto si ritiene che il dosaggio del galattomannano su BAL è utile per fornire in meno di 3 ore importanti informazioni per la diagnosi o per l'esclusione dell'aspergillosi invasiva.

CO9.3

EBV-DNA E MODULAZIONE DELL'IMMUNO-SOPPRESSIONE NEL CONTROLLO DELLE PTLDS POST TRAPIANTO DI FEGATO PEDIATRICO

¹Callegaro A., ¹Nozza F., ²Stroppa P., ²Torre G., ¹Goglio A.

¹Microbiologia e Virologia,

²Divisione di Pediatria, A.O. Ospedali Riuniti

L. go Barozzi 1, 24128 Bergamo

Introduzione.

Il post trapianto di fegato pediatrico è associato nel 4-20% dei casi alla comparsa di malattie linfoproliferative (PTLDs), controllabili con la riduzione dell'immunosoppressione. È in corso un protocollo di diagnosi pre-sintomatica basato sul monitoraggio di EBV-DNA con riduzione dell'immunosoppressione in caso di replicazione virale.

L'obiettivo dello studio è valutare:

- l'efficacia del protocollo nel prevenire lo sviluppo di PTLDS
- se la riduzione dell'immunosoppressione esponga i bambini a un maggiore rischio di rigetto.

Metodi.

Sono stati monitorati per EBV-DNA, mediante real-time PCR (Artus Biotech), per segni di PTLDS e rigetto acuto e cronico, tutti i bambini trapiantati di fegato dal giugno 2003 al giugno 2005. Ai bambini con due determinazioni consecutive di EBV-DNA >10.000 copie/10⁵ LMN è stata ridotta l'immunosoppressione.

Risultati.

Dei 57 bambini in follow-up:

- 30 hanno avuto EBV-DNA sempre <10.000 copie/10⁵ LMN senza sintomi e segni di infezione da EBV o PTLDS;
- 17 hanno presentato EBV-DNA > 10.000 copie/10⁵ LMN ed hanno ridotto l'immunosoppressione;
- 10 hanno sviluppato una PTLDS precoce in concomitanza con l'aumento di EBV-DNA al di sopra del valore soglia.

Vi è un'alta correlazione tra la diminuzione di EBV-DNA e l'inizio della riduzione dell'immunosoppressione (Test di Spearman p<0.01). L'incidenza di PTLDS precoci (non vi sono state forme polimorfiche o monomorfiche) è del 18%. Gli episodi di rigetto sono stati 15 tra i bambini a cui non è stata ridotta l'immunosoppressione e 12 tra quelli a cui è stata ridotta.

Conclusioni.

Il 95% dei bambini asintomatici che hanno ridotto l'immunosoppressione sulla scorta della replicazione virale non ha sviluppato PTLDS. Nel 16% della nostra popolazione il protocollo non è stato applicato per diagnosi clinica e/o istologica di PTLDS precoce e contemporaneo aumento di EBV-DNA al di sopra del valore soglia considerato. Non si evidenzia differenza di rigetto nei bambini a cui è stata ridotta o meno l'immunosoppressione.

comunicazioni orali

SESSIONE 10

Le nuove beta lattamasi: aspetti diagnostici e impatto clinico

Venerdì 22 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, Sala LONDRA

CO10.1

ATTIVITÀ IN VITRO DI TIGECICLINA SUGLI ENTEROBATTERI PRODUTTORI DI ESBL

**Gualandris S.¹, Mugnaioli C.², Endimiani A.¹,
Pallecchi L.², Brigante G.¹, Rossolini G.M.²,
Luzzaro F.¹**

Laboratorio di Microbiologia e Virologia,
Università dell'Insubria e Ospedale di Circolo e
Fondazione Macchi, Varese¹
Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena²

Introduzione.

La tigeciclina è un nuovo farmaco attivo contro un ampio spettro di batteri patogeni che comprende sia i Gram-positivi che i Gram-negativi. Nel nostro studio è stata valutata l'attività della tigeciclina verso isolati clinici di enterobatteri produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL).

Metodi.

Sono stati studiati 280 enterobatteri produttori di ESBL: *Escherichia coli* (n=138), *Klebsiella pneumoniae* (n=64), *Klebsiella oxytoca* (n=14), *Enterobacter aerogenes* (n=25), *Enterobacter cloacae* (n=12), *Serratia marcescens* (n=12), *Citrobacter* spp. (n=15). Gli isolati producevano ESBL di tipo TEM (32%), SHV (38%) o CTX-M (30%). La sensibilità a tigeciclina, doxiciclina ed altri farmaci potenzialmente attivi contro batteri produttori di ESBL è stata valutata mediante microdiluzione in brodo con pannelli dedicati (Microscan, Dade-Behring). I determinanti di resistenza alla tetraciclina [*tet*(A), *tet*(B), *tet*(C) e *tet*(D)] sono stati indagati in tutti i ceppi mediante amplificazione genica.

Risultati.

Sono risultati sensibili alla tigeciclina 275/280 isolati produttori di ESBL (98.2%). Di contro, solo 136/280 ceppi (48.6%) erano sensibili alla doxiciclina. Le percentuali di

sensibilità ad imipenem, ertapenem, ed amikacina erano del 100%, 99.6% e 87.5%, rispettivamente. La sensibilità a gentamicina, co-trimoxazolo e ciprofloxacina era marcatamente più bassa (66%, 58% e 47%, rispettivamente). I valori di MIC_{50/90} per la tigeciclina sono risultati di 0.25/1.0 mg/l. *E. coli* mostrava valori di MIC_{50/90} (0.25/0.5 mg/l) più bassi rispetto alle altre specie, mentre *K. pneumoniae* mostrava i valori più elevati (0.5/2.0 mg/l). L'attività *in vitro* della tigeciclina non era influenzata dalla presenza di geni di resistenza per la tetraciclina.

Conclusioni.

La tigeciclina è risultata attiva contro la maggior parte degli enterobatteri produttori di ESBL. Questo farmaco potrebbe quindi rappresentare una interessante opzione terapeutica per il trattamento di infezioni causate da tali patogeni.

CO10.2

DIFFUSIONE CLONALE DI *PROTEUS* *MIRABILIS* CMY-16 PRODUTTORE IN STRUTTURE DI LUNGODEGENZA RIABILITATIVE

**Migliavacca R.¹, Nucleo E.¹, Spalla M.²,
Martino F.¹, Terulla C.², Balzaretto M.³,
Migliavacca A.⁴, Navarra A.⁵, Pagani L.¹**

¹Dip. S.M.E.C. sez. di Microbiologia, Università di Pavia,
via Brambilla 74, 27100 Pavia;

²Servizio Analisi Microbiologiche IRCCS "S. Matteo",
p.le Golgi, 27100 Pavia;

³Lab. di Microbiologia ASP Piero Redaelli, via B. d'Alviano 74,
20146 Milano;

⁴ASP IARR Istituto Santa Margherita, via Emilia 12, 27100 Pavia;

⁵Lab. di Microbiologia IRCCS "Fondazione S. Maugeri"
via Ferrata 8, 27100 Pavia, Italia.

Introduzione.

L'uso di cefamicine e di inibitori delle β -lattamasi ha

determinato, in specie sprovviste di geni AmpC inducibili, uno slittamento a fenotipi non-ESBL, così come l'incremento della produzione di cefalosporinasi in specie che possiedono tale gene costitutivamente. Gli enzimi di tipo AmpC risultano debolmente inibiti dagli inibitori delle β -lattamasi, sono sempre attivi verso le cefamicine e scarsamente efficaci verso cefepime e ceftipime.

Materiali e metodi.

Nel periodo maggio'03 - marzo'06 sulla base di una diminuita suscettibilità (I/R) a cefotaxime (CTX), sono stati selezionati 160 isolati clinici non replicati di *P. mirabilis* da urine di pazienti ricoverati presso l'ASP S. Margherita, l'IRCCS S. Maugeri, e l'ASP P. Redaelli (Nord Italia). Gli isolati sono stati studiati con metodo CLSI per la produzione di ESBL; gli estratti enzimatici grezzi sono stati caratterizzati con IEF. Metodi di amplificazione, sequenziamento e tipizzazione molecolare sono stati impiegati per individuare i determinanti di resistenza e le relazioni clonali fra gli stipti in esame.

Risultati.

140/160 isolati sono risultati produttori di una ESBL di classe A (CLSI). Il fenotipo di resistenza, era spiccatamente indicativo della produzione di una β -lattamasi di classe C per 16/160 isolati.

Questi ultimi sono risultati produrre 2 enzimi con pI >8.4 e 5.4, di cui solo il primo con attività a spettro esteso. PCR e sequenziamento hanno confermato la produzione dell'enzima CMY-16. Tutti i 16 ceppi di *P. mirabilis* CMY-16 produttori sono risultati clonalmente correlati.

Conclusioni.

La produzione di ESBL di classe C in *P. mirabilis* rappresenta, in Italia, un problema clinico emergente legato ad una diffusione clonale inter ospedaliera; la loro prevalenza risulta però sottostimata, a causa della difficoltà di rivelazione, nella pratica diagnostica corrente.

CO10.3

RUOLO DEL LABORATORIO NELLA RILEVAZIONE DI CLUSTER EPIDEMICI DI K. OXYTOCA ESBL+ ALL'OSPEDALE DI TRENTO

Caola I. *, Sartori R. *, Monterosso M. **, Dallapè P. **, Eccel C. **, Gaino M. *, Ober P. *, Caciagli P.*

*Lab-Microbiologia e virologia - Ospedale di Trento

**Direzione Medica - Ospedale di Trento

Introduzione.

Il laboratorio, tramite la rilevazione di "microrganismi alert", gioca un ruolo fondamentale nel contenimento della loro diffusione in ambito ospedaliero, in particolare in reparti con pazienti esposti a rischio elevato,

quali le unità di terapia intensiva e di patologia neonatale.

Nel presente studio viene riportata l'esperienza nel nostro ospedale nella rilevazione e successivo contenimento di tre cluster epidemici sostenuti da *Klebsiella oxytoca* ESBL+ in terapia intensiva e patologia neonatale nel 1996, nel 2003 e nel 2005.

Metodi e risultati.

La rilevazione del microrganismo multiresistente è stata effettuata dal laboratorio e segnalata rapidamente al reparto, alla coordinatrice del CIO e alle infermiere addette al controllo delle infezioni ospedaliere.

Il primo episodio del 1996 ha coinvolto pesantemente il laboratorio, nella ricerca sia di serbatoi ambientali sia dei portatori nel personale sanitario che nei degen- ti tramite tamponi rettali, cutanei, nasali. *Klebsiella oxytoca* si ritrovava con elevata frequenza nell'intestino nei neonati che veniva colonizzato molto rapidamente e diventava nuova sorgente di trasmissione.

I ceppi isolati da materiali provenienti da pazienti colonizzati e infetti mostravano medesimo biotipo e profilo di sensibilità agli antibiotici. L'analisi dei frammenti di restrizione del genoma ottenuti mediante PFGE ha dimostrato che si era verificata la diffusione di un clone. La gestione dell'episodio epidemico con l'adozione di provvedimenti principalmente rivolti al lavaggio mani, coorte, sorveglianza della colonizzazione intestinale ha permesso l'eliminazione del patogeno dal reparto senza utilizzo di antibiotici.

Nell'ottobre 2003 il laboratorio rilevava la presenza di *K. oxytoca* ESBL+ nell'emocoltura di un bimbo, successivamente deceduto per CID, e nel secreto congiuntivale di un altro neonato degente. In seguito a rapida segnalazione venivano adottate le misure di contenimento e intrapresa la sorveglianza batteriologica. Il cluster epidemico si è prolungato per 9 mesi, nonostante l'adozione rapida di misure di contenimento e sorveglianza, con 15 casi di infezione e 74 di colonizzazione intestinale. Ad un anno di distanza dal primo caso sono stati effettuati tamponi rettali a tutti i degen- ti in un giorno stabilito. La negatività per *K. oxytoca* dei controlli ha confermato che il germe era stato efficacemente eliminato dal reparto.

Nel settembre 2005 il laboratorio ha evidenziato la presenza di *K. oxytoca* ESBL+ con medesimo biotipo nell'essudato nasale di due bimbi. La sorveglianza intrapresa evidenziava la colonizzazione intestinale di un neonato, già dimesso al momento della comunicazione del risultato colturale.

L'esperienza maturata nei precedenti episodi ha impedito la diffusione ad altri neonati. L'analisi delle cartelle cliniche dell'episodio ha evidenziato che i bimbi colonizzati erano state trasferiti da ospedali extrapro- vinciali. Nel tentativo di limitare la diffusione di microrganismi multiresistenti il CIO ha predisposto l'isolamento da contatto per tutti i neonati trasferiti da altri nosocomi fino alla disponibilità dei risultati dei controlli colturali di sorveglianza.