

poster

19 - 20 - 21 - 22 - Settembre 2006

- da 001 a 049* BATTERIOLOGIA
- da 050 a 060A* MICOLOGIA
- da 061 a 079* PARASSITOLOGIA
- da 080 a 126* VIROLOGIA
- da 127 a 128* ASSETTO DELLA MICROBIOLOGIA CLINICA NEL SERVIZIO SANITARIO NAZIONALE
- da 129 a 146* LE INFEZIONI OSPEDALIERE
- da 147 a 158A* LE INFEZIONI URO-GENITALI
- da 159 a 160* MRSA
- da 161 a 194* LA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSTICA BATTERIOLOGICA
- da 195 a 197D* L'APPORTO MICROBIOLOGICO ALLA TERAPIA INFETTIVA
- da 198 a 205* LA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA NEL PAZIENTE TRAPIANTATO.

001

DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA DELLE GASTROENTERITI: PROTOCOLLI ANALITICI UTILIZZATI DAI LABORATORI DEL VENETO

Spolaore P., Fedeli U., Bertollo G.

Sistema Epidemiologico Regionale (SER)
- Veneto, Via Ospedale 18
31033 Castelfranco Veneto (TV)

Introduzione. Al fine di interpretare ed elaborare correttamente i dati provenienti dagli archivi microbiologici nel contesto del progetto regionale di sorveglianza epidemiologica delle infezioni, il SER ha condotto un'indagine conoscitiva sui protocolli adottati dai Laboratori di Microbiologia del Veneto per la diagnostica microbiologica delle gastroenteriti.

Metodi. L'indagine è stata condotta nel 2005 mediante l'invio di una specifica scheda informativa sulla ricerca degli enteropatogeni nei campioni di fecali. Hanno risposto all'indagine i Servizi/Settori di Microbiologia di tutte le Aziende ULSS ed Ospedaliere della Regione Veneto, per un totale di 23 Laboratori.

Risultati. I risultati dell'indagine dimostrano che la quasi totalità dei Laboratori di Microbiologia effettua la ricerca "di routine" dei tre principali enteropatogeni: 23/23 ricercano *Salmonella* spp., 22/23 *Shigella* spp., 19/23 *C. jejuni*. Nessun Laboratorio ricerca "di routine" Norovirus nei campioni fecali e solo 4/23 lo ricercano su specifica richiesta.

La maggioranza dei Laboratori dichiara di essere in grado di effettuare, prevalentemente su "richiesta specifica", la ricerca degli altri enteropatogeni riportati nella Scheda Informativa (*Y. enterocolitica*, *E. coli* O157:H7, Rotavirus, *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp.). Solo alcuni Laboratori dichiarano di non effettuare "in nessun caso" la ricerca di *E. coli* O157:H7 (3/23) e *Cryptosporidium* spp. (2/23).

Per l'isolamento primario degli enteropatogeni batterici, i Laboratori utilizzano una tipologia molto varia di terreni colturali ed in differenti combinazioni; emerge l'uso improprio del Brodo Selenite per l'arricchimento di *Shigella* spp. nei campioni fecali. Fra i metodi "non colturali" utilizzati per la ricerca degli enteropatogeni si conferma la notevole diffusione dei tests rapidi immunocromatografici.

Conclusioni. L'indagine ha fatto conoscere il percorso analitico e la metodologia che i Laboratori della Regione Veneto adottano per la diagnostica microbiologica delle gastroenteriti, ed ha evidenziato una buona aderenza alle Linee Guida proposte dalle maggiori Società Scientifiche nazionali ed internazionali.

002

CORYNEBACTERIUM UREALYTICUM: UN CASO CLINICO DI ENCRUSTED CYSTITIS

Besutti V.¹, De Canale E.¹, Dal Bello F.^{1,2}, Mengoli C.^{1,2}, Palù G.^{1,2}, Polverino B.³, Tata S.³, Antonello A.³, D'Angelo A.³¹Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova²Microbiologia e Virologia, Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

Azienda Ospedaliera - Università Padova

³Clinica Nefrologica I Azienda Ospedaliera-Università di Padova

Introduzione. La EC alcalina è un'infezione ulcerativa cronica della vescica, caratterizzata da depositi di struvite. Questa malattia è stata correlata con la colonizzazione di batteri ureolitici a seguito di procedure urologiche invasive.

Caso clinico. PMR, 67 anni, IVU ricorrenti, macroematuria e calcolosi vescicale dopo cateterizzazione urinaria nel 2004; dal 2005 incontinenza vescicale. La diagnostica per immagini evidenzia calcificazioni nella parete vescicale e idroureteronefrosi bilaterale. Il laboratorio evidenzia funzione renale normale, pH urinario ≥8, piuria >40 x hpf, microematuria. Numerosi calcoli emessi quotidianamente risultano costituiti da ossalato di calcio e da struvite. Urinocolture routinarie risultano negative.

Materiali e Metodi. Materiale biotico vescicale e tre campioni di urina da catetere vengono seminati su: agar cioccolato, agar sangue, agar CNA, Mac-Conkey e CPS₃. Tutti i terreni sono incubati a 37°C per 48 h; i primi tre in microaerofilia, gli altri due in aerobiosi. Vengono eseguite colorazioni al Gram. Per l'identificazione viene utilizzato API Coryne (bioMérieux®) e il sequenziamento dell'unità ribosomiale 16S (rDNA). L'antibiogramma viene effettuato mediante E-test.

Risultati. Le indagini colturali presentano crescita soltanto nei terreni al sangue. Il microrganismo viene identificato come *Corynebacterium urealyticum*. Le urinocolture presentano costantemente una carica microbica ≤10³ ufc/ml, dal materiale biotico si ottengono ≥10⁵ ufc/gr. Le MIC (ug/ml) ottenute: Vancomicina 0.5, Eritromicina 0.023, Claritromicina <0.016, Ciprofloxacina >32, Tetraciclina 0.75, Teicoplanina 0.25, SXT >32, Gentamicina >256, Linezolid 0.047.

Conclusioni. La carica tissutale di *Corynebacterium urealyticum* è suggestiva per un suo ruolo eziologico.

Dopo 2 settimane dall'inizio della terapia con Vancomicina e di lavaggi vescicali con soluzioni acidificanti si è ottenuto un miglioramento della patologia vescicale con riduzione progressiva dell'espulsione di calcoli, della macroematuria, delle incrostazioni vescicali, attenuazione significativa dell'idroureteronefrosi e dell'incontinenza vescicale. Ai controlli routinari il pH urinario risulta <7, la piuria ≤10 per hpf, la ricerca del microrganismo nelle urine è risultata negativa.

003

CAMPYLOBACTER ED ANTIBIOTICO-RESISTENZE: OSSERVAZIONI IN QUATTRO ANNI DI SORVEGLIANZA

Bonanno C.L., Cava M.C., Rosati C., Monteleone R., De Sandro M.V., Dastoli F., Spanò A.

U.O.C. Microbiologia e virologia - Ospedale " Sandro Pertini" - Roma

Introduzione. Nell'ambito della Sorveglianza delle Diarree Infettive il nostro laboratorio di Microbiologia è dal 2000 Centro di Riferimento Regionale per *Campylobacter*. Malgrado *Campylobacter* sia sicuramente responsabile di gastroenteriti soprattutto nell'età pediatrica, la ricerca, obbligatoria in quanto inserita nel Tariffario Nazionale alla voce "Coprocultura", rimane poco acquisita da molti laboratori. Bastano pochi elementi diagnostici (colorazione di Gram, prova di catalasi e ossidasi) di colonie cresciute su opportuno terreno di coltura in microaerofilia per l'identificazione, anche presso laboratori di base. La resistenza a cefalotina e trimetoprim-sulfametossazolo è di ausilio alla diagnosi. La scarsa attenzione al *Campylobacter* insieme a problemi legati all'invio dalle varie realtà locali è responsabile dello scarso numero di ceppi che affluiscono al nostro laboratorio, dove vengono tipizzati e antibiogrammati.

Metodi. Nel quadriennio 2001-2004 sono stati raccolti 128 ceppi da campioni fecali di pazienti prevalentemente pediatrici. Tali ceppi, previa crescita su terreno selettivo, sono stati biotipizzati secondo la tecnica di Lior (idrolisi ippurato, presenza DNAsi, produzione idrogeno solforato). La sensibilità agli antibiotici è stata testata con metodo Kirby-Bauer in agar Mueller-Hinton sangue al 5%.

Risultati. *C. jejuni* (83%) risulta prevalente rispetto a *C. coli* ed il biotipo 1 tra i *C. jejuni* (56%) ed i *C. coli* (72%) conferma la prevalenza già accertata in altri studi nazionali. *C. coli* si conferma più resistente di *C. jejuni* a varie molecole. La resistenza alla eritromicina, antibiotico d'elezione nella terapia delle gastroenteriti da *Campylobacter*, si attesta intorno al 6.2%; per i chinoloni (acido nalidixico-ciprofloxacina) si registra un aumento.

Conclusioni. I chinoloni, un tempo considerati utili nel trattamento e nella diagnostica delle *Campylobacteriosi*, non possono più essere considerati tali. Il generale incremento di resistenza sembra riconducibile all'uso ed abuso di macrolidi (come promotori di crescita) e chinoloni in campo zootecnico, agricolo e medico. Auspicabile risulta quindi sempre il saggio di sensibilità almeno verso queste molecole.

004

RESISTENZA AI FLUOROCHINOLONI IN STREPTOCOCCI DI GRUPPO G ISOLATI DA PAZIENTI DIABETICI

Brigante G., Luzzaro F., Bettaccini A., Lombardi G., Pini B., Sokeng G., Toniolo A.Q.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Università dell'Insubria e Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

Introduzione. La resistenza ai fluorochinoloni (FQ) è un

problema emergente negli streptococchi. Nei pazienti diabetici gli streptococchi di gruppo G (GGS) possono causare infezioni della cute e dei tessuti molli. Questi batteri sono in genere sensibili ai farmaci di uso clinico, inclusi i FQ. Si è valutata la sensibilità agli antibiotici dei GGS isolati presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale di Varese.

Metodi. Sono stati studiati i ceppi di GGS isolati dal 2000 al 2005. L'identificazione sierologica è stata ottenuta mediante agglutinazione su latex (Strepto slide, Dienes, Siena). La sensibilità a penicillina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina è stata determinata mediante Etest (AB Biodisk, Solna, Svezia). Le mutazioni della "Quinolone Resistance Determining Region" sono state analizzate mediante amplificazione genica e sequenziamento diretto.

Risultati. Da 202 pazienti sono stati isolati 210 ceppi di GGS. Tutti gli isolati erano sensibili alla penicillina, mentre si è riscontrata resistenza ad eritromicina (6.7%), clindamicina (4.8%) e tetraciclina (21.4%). In 33/210 (15.7%) isolati, ottenuti da ulcere cutanee di pazienti diabetici, si è osservata resistenza ad alto livello verso i FQ (ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina). La resistenza ai FQ non era associata a resistenza verso altri antibiotici. Mediante sequenziamento sono state evidenziate mutazioni dei geni *parC* (Ser79-Phe) e *gyrA* (Ser81-Phe e/o Glu85-Ala). Non si sono riscontrate mutazioni significative dei geni *gyrB* e *parE*.

Conclusioni. I risultati dello studio documentano la comparsa di resistenza ad alto livello ai FQ negli streptococchi di gruppo G. Le mutazioni riscontrate in *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* appaiono simili a quelle già descritte in *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. Tali risultati indicano l'opportunità di valutare la MIC dei FQ negli streptococchi di isolamento clinico, almeno in pazienti sottoposti a trattamenti prolungati con questi farmaci.

005

EFFICACIA DI FILTRI MONOUSO PER LA PREVENZIONE DELL'ESPOSIZIONE DA LEGIONELLA

Cabodi D., Bonfrate N., Tortorelli F., Franzin L.

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

Introduzione. *Legionella* spp. può causare infezioni nosocomiali in pazienti immunocompromessi. Nonostante il trattamento dell'acqua con metodi di disinfezione sistemica, l'acqua può ancora contenere basse concentrazioni di batteri che possono tuttavia causare infezioni. Scopo del lavoro è valutare l'efficacia di filtri monouso, applicati a punti di erogazione distali dell'acqua, nell'eliminare la contaminazione da *Legionella*.

Metodi. Campioni di acqua calda (5 litri) sono stati prelevati da 15 rubinetti di reparti di 2 impianti idrici ospedalieri. Sono stati determinati: concentrazione di *Legionella*, pH, cloro libero, carica batterica totale (CBT) eterotrofica a 37°C e 25°C, Amebe a 25°C. Dopo installazione di filtri PALL Aquasafe Mini L (Nylon 0.2µ) e normale utilizzo dell'acqua per 2 settimane, sono stati prelevati campioni da 1 litro e ripetute le analisi. Il metodo usato per la ricerca culturale di *Legionella* (filtrazione con membrane 0.2µ, terreni BCYE,

BMPA, MWY a 37°C per 15 giorni) consentiva di rilevare 20 cfu/L nei campioni eseguiti prima del filtro e 1 cfu/L dopo il filtro. RT-PCR per *Legionella* è stata eseguita su alcuni campioni.

Risultati. La ricerca di *Legionella* è risultata positiva prima dell'installazione dei filtri in 11 campioni dell'Ospedale A (20-400 cfu/L *L.pneumophila* 3, temperatura media 48.9°C) e in 4 campioni dell'Ospedale B (2000-4800 cfu/L *L.spp* e *L.spp* fluorescente, temperatura media 43°C) e negativa dopo l'installazione dei filtri (Ospedale A, temperatura media 50.9°C, Ospedale B, 39.5°C). RT-PCR per *Legionella* eseguita su 5 campioni dell'Ospedale A dopo filtro ha confermato il risultato. Riduzione significativa di CBT (<1 cfu/mL) è stata osservata nei campioni prelevati dopo i filtri.

Conclusioni. I filtri monouso applicati per 2 settimane nei punti di erogazione distali dell'acqua hanno eliminato completamente *Legionella* ed hanno ridotto significativamente CBT. Questi filtri possono prevenire l'esposizione dei pazienti ad alto rischio ai patogeni presenti nell'acqua, previo uso corretto e limitatamente ai rubinetti dove vengono applicati.

006

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI *HELICOBACTER PYLORI* RESISTENTI A TERAPIE ERADICANTI

Cabodi D., Franzin L.

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

Introduzione. L'infezione da *Helicobacter pylori* (*Hp*) è probabilmente una delle infezioni croniche più diffuse. Il trattamento antibiotico per l'eradicazione viene consigliato in presenza di una sintomatologia gastrica severa, ma talvolta si mostra inefficace per la presenza di resistenze primarie o secondarie. Lo scopo del lavoro è valutare la sensibilità agli antibiotici di ceppi di *Hp* isolati da pazienti con recidive. **Metodi.** Sono state analizzate biopsie gastriche prelevate da antro e fondo di 52 pazienti (35 donne e 17 uomini, età media 54 anni, range 33-77) con una storia di uno o più fallimenti di eradicazione. I campioni prelevati sono stati omogenizzati e seminati su piastre di terreno Agar Sangue e Agar Dent, incubate a 37 °C in microaerofilia per almeno 4 giorni. Il test della sensibilità a claritromicina, amoxicillina, metronidazolo e tetraciclina è stato eseguito combinando la tecnica di diffusione da disco ed E-test su terreno Agar Sangue secondo le linee guida.

Risultati. In 33 (63.5%) pazienti è stato possibile effettuare l'isolamento di *Hp*; nei restanti soggetti la coltura è risultata negativa per la presenza di microrganismi contaminanti a crescita rapida. Il risultato dell'antibiogramma, eseguito su 30 ceppi, ha evidenziato resistenza per amoxicillina nel 3%, per claritromicina nel 87% e per metronidazolo nel 74%. Nessun isolato si è mostrato resistente alla tetraciclina. Tutti i ceppi hanno presentato resistenza ad almeno un antibiotico e nel 60% dei casi resistenza contemporanea a claritromicina e metronidazolo, probabilmente dovuta a resistenze secondarie legate all'uso frequente di queste molecole per il trattamento delle infezioni da *Hp*.

Conclusioni. I risultati mostrano: 1- elevata percentuale di

resistenza di *Hp* per le due molecole più frequentemente utilizzate nelle terapie eradicanti; 2- l'utilità dei test di sensibilità che evidenziano la possibilità di utilizzare la tetraciclina come antibiotico alternativo nel caso di fallimento di eradicazione di *Hp* con terapie standard.

007

INFEZIONE DA *MYCOBACTERIUM CHELONAE*: DESCRIZIONE DI UN CASO CLINICO

Caola I.*, Sicher C.**, Sartori R.*, Paternoster C.***, Caciagli P.*

* Laboratorio di Microbiologia e Virologia
- Ospedale di Trento - L.go Medaglie d'Oro 7 - 38100 Trento
** U.O. Dermatologia - Ospedale di Trento
- L.go Medaglie d'Oro 7 - 38100 Trento
*** Sezione Autonoma di Malattie Infettive
- Ospedale di Trento - Via Malta 16 - 38100 Trento

Nel maggio 2005 giungeva all'osservazione del dermatologo dell'Ospedale S.Chiara di Trento una giovane donna di 24 anni, di professione estetista, che presentava da circa un mese, una lesione alla coscia destra in placca (diametro 7 x 5 cm), formata da piccoli noduli palpabili alternati a tessuto lasso di colorito violaceo, associata a dolore modesto alla palpazione e deambulazione. Riferiva la comparsa nell'ultima settimana di due lesioni simili, più piccole, alle caviglie. Era stata trattata con antibiotici topici (gentamicina e tetraciclina) senza beneficio.

Sulle lesioni della coscia è stato effettuato un prelievo, mediante aspirazione di materiale purulento, per esame microbiologico. Un campione è stato prelevato anche per esame istologico.

L'esame microscopico con colorazione di Ziehl Neelsen ha evidenziato la presenza di numerosi batteri alcool-acido resistenti. L'amplificazione genica per la ricerca del genoma di *M.tuberculosis*, eseguita con sistema ProbetecET - BD, è risultata negativa. Le colture per micobatteri effettuate in MGIT e in Loewenstein Jensen, sia su materiale tal quale che dopo fluidificazione e decontaminazione, hanno evidenziato la crescita di numerose colonie di micobatteri, dopo 15 giorni nei terreni mantenuti a temperatura ambiente e dopo 20 giorni in quelli incubati a 37°.

Il ceppo è stato tipizzato dal Laboratorio di Microbiologia dell'Istituto Villa Marelli-Ospedale Niguarda di Milano come *Mycobacterium chelonae*.

Il saggio di sensibilità effettuato con E Test ha rilevato la sensibilità nei confronti di claritromicina, la resistenza ad amikacina e cefoxitina; ciprofloxacina ha mostrato una MIC di 2 µg /mL (intermedio).

L'istologia evidenziava flogosi acuta suppurativa, rare cellule giganti, ricerca dei micobatteri negativa.

La terapia, impostata precocemente in base al risultato dell'esame microscopico, con claritromicina per os 500 mg x 2 die, è stata prolungata per 6 mesi, tempo richiesto per la lenta graduale risoluzione del quadro clinico. Nella sede della pregressa lesione è residua una piccola area cicatriziale.

La collaborazione tra dermatologo, microbiologo ed infettivologo ha portato all'effettuazione della diagnosi in tempi rapidi ed ha permesso l'impostazione di un trattamento terapeutico corretto, condizionando positivamente l'outcome clinico.

008

IDENTIFICAZIONE DI *L. PNEUMOPHILA* DA CAMPIONI DI ACQUA MEDIANTE PCR-REAL TIME (HOME MADE)

Capicotto R., Quirino A., Lamberti A. G., Barreca G. S., Puccio R., Giannotti A., Vinci M., Lo Russo T., Focà E., Matera G., Liberto M. C.

Cattedra di Microbiologia, Università "Magna Graecia" di Catanzaro

Introduzione. *L. pneumophila* è responsabile della legionellosi, una malattia infettiva che presenta differenti quadri clinici, quali la Malattia dei Legionari e la Febbre di Pontiac. Le infezioni da Legionella sono considerate un problema epidemiologicamente rilevante in Sanità Pubblica per la capacità di questo batterio di infiltrarsi nei sistemi di distribuzione dell'acqua; tutto ciò richiede un monitoraggio continuo soprattutto in ambienti comunitari, quali ospedali, alberghi ed altri tipi di strutture ricettive. Scopo del presente studio è stato quello di mettere a punto un test in PCR-real time e di compararlo al metodo colturale (che ad oggi rappresenta ancora il "gold standard") per l'identificazione di Legionella in campioni di acqua per uso domestico ed in ambienti comunitari.

Metodi. Sono stati analizzati 201 campioni di acqua provenienti da hotel, residence e ospedali presso l'U.O. di Microbiologia Clinica, Università degli Studi "Magna Graecia" di Catanzaro (Centro Regionale per la Diagnosi di Legionellosi per la Calabria), in un periodo compreso tra giugno 2005/dicembre 2005. Due tecniche di arricchimento del campione (filtrazione e centrifugazione) e due tecniche di estrazione del DNA (manuale ed in automatico) sono state comparate. Per valutare la presenza dei geni di Legionella genere-specifico (16S rRNA) e specie-specifico (*mip*) in PCR real-time, è stata utilizzata la colorazione SYBR Green in associazione allo strumento LightCycler (Roche Diagnostics, Italy).

Risultati. I risultati ottenuti dopo filtrazione del campione ed estrazione in automatico del DNA, mostravano un aumento della sensibilità del 3% rispetto al metodo colturale.

Conclusioni. L'associazione tra arricchimento per filtrazione, estrazione del DNA eseguita in automatico e PCR real-time costituisce una procedura ottimale che è in grado di fornire dati paragonabili a quelli ottenuti con il metodo colturale, riducendo i tempi di esecuzione e di refertazione.

009

CONFRONTO TRA DUE METODICHE PER LA RILEVAZIONE DELLA FARMACO-RESISTENZA IN *M. TUBERCULOSIS* COMPLEX

Romano S., Bernassola M., Cava MC., Cappiello G., Longo R., Visca M., Bonanno C.L., Spanò A.

UOC Microbiologia, Virologia ed Immunologia
Ospedale S. Pertini-Roma

Introduzione. La malattia tubercolare sta riemergendo nei paesi industrializzati per la diffusione dell'HIV, per l'immi-

grazione dai paesi in cui è endemica e per l'insorgenza di ceppi di *M. tuberculosis* (MTB) resistenti a uno o più farmaci primari utilizzati nella terapia (MDR-TB).

Obiettivo. Poiché la diagnosi precoce e l'identificazione dei ceppi resistenti sono fattori essenziali per il controllo della malattia, abbiamo confrontato il metodo usato nel nostro laboratorio (BACTEC MGIT 960 SIRE) con un metodo molecolare più rapido (Genotype-MTBDR).

Metodi. Il metodo molecolare rileva la resistenza di MTB alla rifampicina (RIF) e all'isoniazide (INH) associata rispettivamente ai geni *rpoB* e *katG*; in particolare il test evidenzia le mutazioni più frequenti in *rpoB* (D516V, H526Y/D, S531L) mentre per *katG* considera una sola mutazione amminoacidica codificata da due codoni diversi (S315T1, S315T2).

Risultati. Dal 01/07/2002 al 09/05/2006 sono stati isolati 44 MTB prevalentemente da secrezioni delle basse vie respiratorie.

Dal confronto è emerso che i risultati per INH concordano per l'89% (39/44). I 5 ceppi discordanti sono resistenti con il sistema BACTEC MGIT 960 SIRE solo ad una bassa concentrazione (0.1 µg/ml) e sensibili con il metodo molecolare.

Nel caso della RIF la concordanza è pari al 91% (40/44): il metodo MGIT rileva 1 caso di resistenza mentre il metodo molecolare 5.

Conclusioni. La resistenza alla RIF, emersa con il metodo molecolare, nei quattro casi discordanti è dedotta dall'assenza della forma wild-type di *rpoB* senza che nessuna delle mutazioni contemplate nel test venga evidenziata. Per l'INH il metodo molecolare indaga solo mutazioni nel gene *katG*, non considerando regioni, come *inhA* e *oxyR-ahpC*, frequentemente associate ad una resistenza a basse concentrazioni di farmaco.

L'analisi verrà approfondita attraverso il sequenziamento diretto dei geni *rpoB*, *katG*, *inhA* e *oxyR-ahpC*, per confermare o evidenziare nuove possibili mutazioni associate a resistenza.

010

INFEZIONE POST CHIRURGICA DA MYCOBACTERIUM XENOPI: CASO CLINICO

Cava M.C.¹, Cappiello G.¹, Manetti G.², Monteleone R.¹, Visca M.¹, Balducci L.¹, Dastoli F.¹, Spanò A.¹

¹U.O.C. Microbiologia, Virologia e Immunologia

²U.O.C. Chirurgia Oncologica

Ospedale "S. Pertini"-ASL RM B - Roma

Introduzione. *Mycobacterium xenopi* è un bacillo alcolico resistente scotocromogeno, frequentemente isolato da acque calde e fredde, incluse quelle degli ospedali. Generalmente è responsabile di infezioni polmonari simili alla tubercolosi e di infezioni anche generalizzate in soggetti immunodepressi.

Caso clinico. Paziente di 51 anni, maschio, sottoposto presso altre strutture a ripetuti interventi chirurgici per discopatia lombosacrale, nel maggio 2005 veniva sottoposto a intervento chirurgico per recidiva di ernia discale L4-L5, in un quadro di spondilodiscite. Esami microbiologici eseguiti in quella data risultavano negativi, ma circa 10 mesi dopo il paziente presentava di nuovo segni di recidiva. TAC e

RMN a livello L4-L5-S1 evidenziavano “tessuto solido calcifico per esiti di spondilodiscite con ascessualizzazione ossifluente”. Un drenaggio chirurgico dal sito interessato evidenziava materiale caseoso che rafforzava l'ipotesi di morbo di Pott. Una successiva RMN mostrava a livello del muscolo psoas dx una raccolta ascessuale, che veniva drenata a distanza di 10 giorni dal 1° intervento. Esami batterioscopici risultavano negativi per BAAR. Su suggerimento del microbiologo, allo scopo di verificare la sospetta patologia tubercolare in attesa dell'esame colturale per micobatteri, veniva eseguito sul plasma del paziente il dosaggio dell'interferone gamma con il test Quantiferon TB-Gold, che risultava negativo. Dalla coltura liquida MGIT di entrambi i materiali drenati è stata osservata crescita di BAAR dopo circa 14 giorni medi dall'inoculo. La tipizzazione molecolare da coltura ha identificato *M. xenopi*.

Discussione. La successione degli eventi anamnestici depongono per una infezione ospedaliera post-chirurgica da *M. xenopi*. Il dosaggio dell'interferone gamma con il test Quantiferon TB-Gold, uno dei nuovi strumenti per la diagnosi di infezione tubercolare latente e/o attiva, si è rivelato utile nella diagnosi differenziale con la spondilodiscite tubercolare.

011

FREQUENZA DI ISOLAMENTO DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES* DA TAMPONI FARINGO-TONSILLARI E RESISTENZA AI MACROLIDI A 14 ATOMI DI CARBONIO.

Caruso V., Piccoli S., Nisticò S., Borelli A., Piccoli M., Carlei M., Luciano A.

S.C. di Microbiologia e Virologia, A.S. N°6, Lamezia Terme.

Introduzione. *Streptococcus pyogenes*, principale agente etiologico di faringo-tonsilliti batteriche, soprattutto nei bambini, ha sviluppato dal '93 un aumento notevole di resistenze ai macrolidi. Infatti, pur restando la penicillina l'antibiotico di scelta in questo tipo di infezione, i macrolidi rappresentano una alternativa molto diffusa. In questo lavoro abbiamo valutato la frequenza di isolamento di *Streptococcus pyogenes* isolato da tamponi faringei e la resistenza nei confronti dei macrolidi a 14 atomi di carbonio.

Metodi. Da Gennaio 2005 a Maggio 2006 abbiamo processato 3300 tamponi faringei pervenuti al nostro laboratorio da pazienti ricoverati e da utenti esterni.

La ricerca di *Streptococcus pyogenes* è stata effettuata su agar sangue columbia (CNA) incubato overnight a 37°C e in microaerofilia (7% CO₂). Le colonie beta emolitiche sospette sono state isolate in sub-coltura su agar sangue montone e successivamente testate con antisieri al lattice per la ricerca del gruppo A (Slidex strepto A bioMérieux). Come conferma al test al lattice, le colonie che hanno dato esito positivo sono state identificate utilizzando il sistema ATB EXPRESSION bioMérieux, (Rapid card 32 strep). La sensibilità ai macrolidi è stata valutata utilizzando la galleria ATB strep bioMérieux.

Risultati. Dei 3300 campioni testati 131 (3,9%) sono risultati positivi per la presenza di *Streptococcus pyogenes*. Il saggio di sensibilità ai macrolidi a 14 atomi di carbonio,

effettuato utilizzando come rappresentante di questa famiglia l'eritromicina, ha evidenziato la presenza di 57 (43%) ceppi resistenti.

Conclusioni. I dati ottenuti evidenziano una percentuale di incidenza del 3,9%, che dimostra come la faringo-tonsillite sia per la maggior parte dei casi una patologia ad etiologia virale. L'elevata percentuale di resistenza ai macrolidi a 14 atomi suggerisce un abuso di questi farmaci nella terapia. Sarebbe auspicabile, affinché questi valori possano rientrare nei limiti accettabili, ridurre drasticamente il loro uso, riservandolo solo ai casi in cui sia necessaria una terapia alternativa alle beta lattamine.

012

FREQUENZA DI *STAPHYLOCOCCUS SPP* CON RESISTENZA INDUCIBILE ALLA CLINDAMICINA SAGGIATA IN MUELLER HINTON AGAR + 2% DI NaCl.

Casella P.,¹ Straface C.,¹ Scarabelli F.,¹ Vailati F.²

¹SMEL A.O. "Ospedale di Vimercate" Presidio di Vimercate, Via C.Battisti 23, 20059 Vimercate.

²USC Microbiologia e Virologia, A.O. OORR Bergamo, largo Barozzi 1, 24128 Bergamo.

Introduzione. I sistemi automatici per gli antibiogrammi usati nella routine clinica devono essere integrati con metodi aggiuntivi fenotipici manuali, per la rilevazione di alcune resistenze.

E' stato valutato l'uso di Mueller Hinton agar + 2% di NaCl (MH-NaCl) - utilizzato per la conferma della meticillina resistenza - per rilevare la resistenza inducibile alla clindamicina in ceppi di *Staphylococcus spp*.

Metodi. Lo studio è stato condotto su 300 ceppi di *Staphylococcus spp* non duplicati, isolati da materiali diversi da urine nel Laboratorio del P.O. di Vimercate nel periodo febbraio-dicembre 2005. Per tutti gli isolati si è proceduto all'identificazione e allo studio di sensibilità con Vitek2. E' stata prima condotta una valutazione pilota con 34 ceppi di *Staphylococcus spp* a sensibilità nota - isolati dal Laboratorio di M.V. degli Ospedali Riuniti di Bergamo - saggiando in parallelo MH e MH-NaCl. Il saggio manuale è stato condotto in MH-NaCl con tecnica del doppio disco di clindamicina (2µg) ed eritromicina (15µg).

Risultati. La concordanza tra MH e MH-NaCl nella fase pilota è stata completa. Sono stati studiati 175 *S. aureus* e 125 stafilococchi coagulasi negativi (CoNS). La frequenza di resistenza inducibile alla clindamicina nel campione, rilevata con la tecnica del doppio disco, è stata del 16%, del 16.5% in *S. aureus* e 14.4% in CoNS. Nessuna resistenza inducibile è stata rilevata con Vitek 2 su questi ceppi, come ci si poteva aspettare.

Conclusioni. L'utilizzo di MH-NaCl si è dimostrato particolarmente utile, consentendo di rilevare su un'unica piastra la resistenza all'oxacillina, la resistenza inducibile alla clindamicina ed eventualmente la presenza di beta lattamasi in *Staphylococcus spp*. La ricerca di questa resistenza dovrebbe essere routinariamente inserita in aggiunta a Vitek2.

013

VALUTAZIONE DI UN METODO DIRETTO PER L'IDENTIFICAZIONE E L'ANTIBIOGRAMMA DA EMOCOLTURE CON SISTEMI AUTOMATICI.

Frugoni S.¹, Consoli D.¹, Vismara C.², Viola G.², Conte E.²

¹ASP I.M.M. e S. e P.A.T., servizio di Medicina di Laboratorio, Via Trivulzio 15, 20146 Milano.

²Laboratorio Analisi Cliniche e Microbiologia, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, via Venezian 1, 20133 Milano.

Introduzione. Il ruolo dell'emocoltura nel paziente settico ha lo scopo di indirizzare un corretto e mirato approccio terapeutico. Effettuare direttamente dal flacone identificazione ed antibiogramma può dare informazioni importanti in tempi brevi. L'introduzione di strumentazioni automatiche ha facilitato il riscontro dei patogeni nel sangue, tuttavia il tempo intercorrente tra il rilevamento di positività ed il referto microbiologico risulta ancora lungo. Obiettivo del nostro lavoro è la valutazione di un metodo rapido, semplice, a basso costo e applicabile nella routine, che permetta di ridurre i tempi di risposta nella diagnosi delle batteriemie.

Metodi. Sono stati utilizzati sistemi automatici Vitek (bioMérieux) Senior al Pio Albergo Trivulzio (centro1), "two" all'Istituto dei Tumori (centro2). 7ml della coltura sono stati trasferiti in provetta utilizzando sistemi di prelievo sottovuoto e centrifugati a 1000 rpm per 10 minuti. Il sovrantante separato è stato ulteriormente centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti. Al precipitato sono stati aggiunti 0.5 mL di BHI. La sospensione batterica ottenuta è stata portata alla concentrazione idonea per l'inoculo. Sono state contemporaneamente allestite colture standard in terreni idonei. Si sono confrontati i risultati.

Risultati. Nei centri 1 e 2 sono stati isolati ed esaminati rispettivamente 62 e 29 microrganismi gram negativi, 30 e 39 gram positivi. Le concordanze di identificazioni per i microrganismi gram negativi sono risultate rispettivamente del 100% e del 86,2 %; Per i gram positivi le concordanze sono rispettivamente del 93,3% e del 61,5%. Per l'antibiogramma dei gram negativi sono stati testati 903 antibiotici (centro 1) e 528 (centro 2). L'analisi ha evidenziato che: il centro 1 ha riportato lo 0,22% di Grossi Errori (GE), 0,82 Errori Maggiori (EM), 1,10 Errori Minori (EM). Il centro 2 invece: 0,75 Grossi Errori (GE), 1,32 Errori Minori (EM). Per i gram positivi sono stati testati rispettivamente 425 e 511 antibiotici. L'analisi ha evidenziato che il centro 1 ha riportato 0,47% di Grossi Errori (GE), 0,94% di Errori Maggiori (EM) e l'1,41% di Errori Minori (EM). Il centro 2 invece lo 0,20% di Grossi Errori (GE), 0,20 Errori Maggiori (EM) e l'1,17% di Errori Minori (EM).

Conclusioni. la bassa percentuale di GE di EM e di Em ottenuta, il basso costo e l'impatto nella routine di laboratorio, giustificano l'utilizzo di un metodo diretto tramite strumentazioni automatiche perché permette di impostare una terapia antibiotica mirata in tempi brevi.

014

TREND DI ANTIBIOTICO RESISTENZA NELLE INFEZIONI INVASIVE: I RISULTATI DELLA SORVEGLIANZA AR-ISS

D'Ancona F.^{*}, Alfonsi V.^{*}, Giannitelli S.^{*}, Ciofi degli Atti M.L.^{*}, Monaco M.[^], D'Ambrosio F.[^], Del Grosso M.[^], Pantosti A.[^], ed il gruppo AR-ISS.

^{*}Reparto Malattie Infettive - Centro nazionale di epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute (CNESPS),
[^] Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità (Iss)
Viale Regina Elena 299 - 00161 Roma

Introduzione. Il progetto AR-ISS coordinato dall'ISS, è una rete di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza, basata su circa 50 laboratori sentinella reclutati su tutto il territorio nazionale, che inviano isolati e dati di sensibilità agli antimicrobici testati durante la routine di laboratorio. I patogeni sotto sorveglianza sono: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, *Escherichia coli*, isolati da liquor e sangue.

Vengono in questo lavoro presentati i principali risultati per ciascun patogeno, per gli anni 2003-2005.

Metodi. I dati vengono raccolti trimestralmente con modelli cartacei o su supporto informatico.

Risultati. Tra gli stafilococco aurei il 39,9% era meticillino resistente, senza importanti variazioni negli anni.

Per lo *Streptococcus pneumoniae*, la frequenza di non-sensibilità alla penicillina risulta mediamente il 12%, mentre elevatissima rimane la resistenza ai macrolidi (31,6%), con un trend annuale oscillante.

Nonostante la vancomicina sia una importante risorsa nel trattamento delle infezioni invasive da enterococchi, prevalenza di ceppi di *Enterococcus faecium* resistenti (20%) è piuttosto elevata.

Il 91% dei campioni di *Klebsiella pneumoniae* ed il 74% di *K. oxytoca*, risultano resistenti all'ampicillina. Per questi microrganismi risulteranno molto interessanti i risultati per le ESBL, informazione che sarà inclusa nella sorveglianza AR-ISS a partire dal prossimo anno.

Per *Escherichia coli* le resistenze alle aminopenicilline (54%) ed ai fluorochinoloni (28,6%) continuano ad essere un importante problema.

Conclusioni. ARISS fornisce dati di resistenza agli antimicrobici dal 2001. Questi dati sono utili per monitorare la situazione italiana confrontandola a livello europeo con i dati della rete EARSS che sorveglia gli stessi eventi.

015

ATTIVITÀ DEL CENTRO DI RIFERIMENTO DEL VENETO PER LA TIPIZZAZIONE DELLE SALMONELLE DELL'ANNO 2005.

De Canale E.¹, Tessari A.¹, Cassano C.¹, Tommasini T.¹, Palù G.^{1,2}.

¹Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova.

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

Introduzione. Il centro di riferimento regionale per la tipizzazione delle Salmonella del Veneto è situato dal 1 gennaio 2005 presso il Servizio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Il centro opera nell'ambito del sistema ENTER-NET Italia coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, e si occupa della tipizzazione di specie di tutti i ceppi di Salmonella isolati dai laboratori periferici della regione, cura la raccolta dei dati relativi a ciascun campione e provvede alla notifica delle informazioni sugli isolati all'ISS. Contestualmente alle Salmonella sono giunti alla nostra attenzione ceppi di altri batteri enteropatogeni isolati sempre nel corso del 2005 presso strutture sanitarie venete.

Metodi. Nel corso 2005 sono pervenuti al nostro centro 619 ceppi di Salmonella di origine umana provenienti da 18 strutture ospedaliere pubbliche e da 3 private convenzionate del Veneto. Tutti i ceppi di Salmonella sono stati tipizzati mediante agglutinazione rapida su vetrino seguendo lo schema di Kauffman-White. Il processo prevede l'agglutinazione somatica O e l'agglutinazione flagellare H di fase I e fase II precedute, quando necessario, dalla separazione delle due fasi flagellari.

Risultati. I sierotipi di Salmonella più frequentemente riscontrati nel nostro territorio nel corso del 2005 sono quelli appartenenti ai gruppi B (O:4) e D₁ (O:9) che contano rispettivamente 336 (54%) e 155 (25%) isolati, mentre minori sono stati i riscontri di ceppi di gruppo C₂-C₃ (O:8), 42 isolati (6%), del gruppo C₁ (O:7) 35 isolamenti (4%) e dei gruppi E, 9 isolati (1%) ed F, 5 isolamenti (1%). Le Salmonelle prevalenti sono risultate essere *S. typhimurium* (54%), *S. enteritidis* (24%), *S. infantis* (3%), *S. blockley* (3%) e *S. thompson* (2%).

Conclusioni. L'attività 2005 del centro di tipizzazione delle Salmonelle ha potuto contare su di una buona adesione al programma di sorveglianza da parte delle strutture sanitarie della regione Veneto, rendendo possibile delineare un quadro epidemiologico degli isolamenti di Salmonella da matrice umana piuttosto preciso.

Il 78% degli isolati è rappresentato dai due sierotipi *S. typhimurium* e *S. enteritidis*, per i quali si rende necessaria l'adozione di strumenti di subtipizzazione molecolare nel corso di indagini epidemiologiche.

016

EFFICACIA DELLA STRATEGIA DI PREVENZIONE DELLE SEPSI NEONATALI DA *S. AGALACTIAE* NEI BIENNI 2002-03 E 2004-05

Veneri M.R., Di Gennaro M., Oliviero A., Scognamiglio R., D'Amora C., De Rosa P.

ASL NA 5, U.O. Microbiologia - Servizio di Patologia Clinica, DEA II LIVELLO Castellammare - Gragnano.

Introduzione. Lo Streptococco B emolitico di gruppo B (SGB) risulta essere il maggiore responsabile delle sepsi neonatali, causando malattie precoci o tardive. La trasmissione può verificarsi sia per via materna attraverso il canale del parto o l'ingestione del liquido amniotico infetto, sia per cross-infezione nella nursery.

Il nostro obiettivo è verificare attraverso uno studio di prevalenza relativo ai bienni 2002-03 e 2004-05, l'utilità dello screening alla 35^a-37^a settimana di gestazione per la prevenzione delle sepsi da SGB.

Metodi. La ricerca dell'SGB è stata effettuata negli essudati vagino-rettali delle donne alla 35^a-37^a settimana di gestazione e nelle emocolture e liquorcolture di neonati con segni di sepsi grave.

I campioni pervenuti sono stati seminati su terreno selettivo (CNA). Dopo 24-48 h di incubazione le colonie sospette B emolitiche e catalasi negative sono state identificate mediante test rapido di agglutinazione con antisieri in commercio.

Risultati. Biennio 2002-03: su un totale di 498 essudati vagino-rettali analizzati, la percentuale di isolamento dell'SGB è stata del 12.5%, in linea con i dati della letteratura; le emocolture e liquorcolture positive del reparto Neonatologia sono state 38 e la percentuale di isolamento dell'SGB è stata del 18.4%.

Biennio 2004-05: su 668 essudati vagino-rettali analizzati, la percentuale di isolamento dell'SGB è stata del 9%; le emocolture e liquorcolture positive della Neonatologia sono state 87 e la percentuale di isolamento dell'SGB è stata del 8.8%.

Conclusioni. Dal nostro studio si evince sia un incremento (c.a 15%) del numero di gestanti sottoposte allo screening per l'SGB, sia un decremento (c.a 10%) delle infezioni neonatali da SGB, confermando l'importanza di una capillare sensibilizzazione presso i reparti di Ginecologia per un'efficace strategia di prevenzione delle infezioni neonatali da SGB.

017

LA DIAGNOSI DELLE INFEZIONI DA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ENTEROSSICO: CONFRONTO FRA METODI

Dei R.¹, Nicoletti P.², Buonomini M.^{1,2}

¹Dipartimento Sanità Pubblica, Università di Firenze,

²Laboratorio Microbiologia e Virologia, AOUC, Firenze.

Introduzione. *Clostridium perfringens* enterossico è un'importante causa di tossinfezioni alimentari ma è anche implicato in diarree, talvolta antibiotico-associate. Il batterio si trova normalmente nell'intestino, per cui il suo reperto qua-

litativo è privo di significato clinico, anche perché per lo più, i ceppi residenti nel normale non producono enterotossine. Riportiamo dati preliminari di confronto fra isolamento quantitativo e ricerca dell'enterotossina fecale specifica.

Metodi. La conta sporale quantitativa è stata eseguita su 85 campioni (da 77 pazienti) con la metodica standard dopo shock etanologico. Per la ricerca dell'enterotossina fecale, aliquote sono state sospese in salina, centrifugate ad alta velocità, ed il sopranatante usato per il saggio di citotossicità, eseguito su tutti i campioni, e per il saggio di agglutinazione passiva inversa al lattice (PET RPLA, OXOID), eseguito su 65 campioni.

Risultati. I campioni provenivano da episodi di tossinfezioni alimentari e da diarree nosocomiali. L'uno o l'altro metodo ha rilevato l'enterotossina in 21 su 21 dei campioni con conte maggiori di 10^6 CFU/gr feci, in 13 su 28 dei campioni negativi o con conte minori o uguali a 10^4 CFU/gr feci ed in 26 su 36 dei campioni con conte intermedie (Chi quadro 19,116; g.d.l. 2; $p < 0,0005$). Citotossicità era dimostrabile in 34 dei 49 campioni RPLA positivi, ed in nessuno dei 16 campioni negativi o dubbi al saggio antigene (Chi quadro 20,580; g.d.l. 1; $p < 0,0005$).

Conclusioni. Abbiamo rilevato una generale concordanza tra i metodi impiegati. La connessione fra alte conte sporali e il reperto di enterotossina fecale attribuisce ad ambedue i metodi una valenza diagnostica; peraltro, essendo la tossina uno dei fattori di patogenicità, riteniamo che il suo reperto sia più immediatamente significativo in senso diagnostico.

018

FREQUENZA DI ISOLAMENTO DI A. CALCOACETICUS - BAUMANNII COMPLEX IN UN REPARTO DI RIANIMAZIONE

Del Gaudio T.¹, Fuzio P.¹, Porzio M.¹, Lacerenza S.²,
Pirroni A.², Del Prete R.³, Miragliotta G.³

¹ Laboratorio Analisi P.O. Andria, AUSL BAT/I

² U.O. Rianimazione P.O. Andria, AUSL BAT/I

³ Cattedra di Microbiologia, Dip. MIDIM, Univ. di Bari

Introduzione. Le infezioni ospedaliere sostenute da *Acinetobacter spp.* rappresentano un problema, sia per l'aumentata resistenza del microrganismo agli antimicrobici, sia perché esso è spesso causa di epidemie. Abbiamo valutato la frequenza di isolamento di *Acinetobacter spp.* e la sua resistenza agli antimicrobici, nel periodo Giugno 2001-Maggio 2006, in un reparto di Rianimazione dotato di 9 posti letto.

Metodi. Identificazione batterica e antibiogramma sono stati eseguiti mediante il sistema VITEK 32 (bioMérieux), il test di sensibilità alla colistina è stato effettuato mediante E-test (Biolife), mentre per la tipizzazione genica dei ceppi è stata utilizzata la metodica Pulsed Field Gel Electrophoresis (Bio-RAD).

Risultati. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex* è stato isolato da 114 pazienti ed esso era presente in 70/114 (61.4%) nel broncoaspirato, in 35/114 (30.7%) nel sangue. È stato inoltre isolato in 9/114 diversi liquidi biologici (7.9%). In 25/114 casi l'isolamento è stato effettuato sia da sangue che da broncoaspirato di uno stesso paziente.

I ceppi isolati hanno mostrato debole sensibilità ai carbapenemici (Imipenem 24.5%; Meropenem 39.4%) alla Ticarcillina+Acido clavulanico (22.8 %), mentre la resisten-

za a β -lattamici, cefalosporine, aminoglicosidi, chinoloni, nitrofurantoina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametossazolo risultava superiore all'80%. Per contro la colistina mostrava una sensibilità del 100%.

Conclusioni. Nonostante le misure di barriera adottate, *A. calcoaceticus-baumannii complex* è stato isolato con elevata frequenza nel periodo considerato ed almeno in tre occasioni ha infettato un numero di pazienti superiore a quello solitamente osservato. In particolare, nel marzo 2006, tale microrganismo è stato isolato da 5 pazienti; la tipizzazione genica eseguita su 4 campioni ha dimostrato che gli isolati appartenevano ad uno stesso ceppo, che esibiva multiresistenza a tutte le classi di antibiotico succitate, mentre si rivelava sensibile alla colistina. I prelievi ambientali, eseguiti per individuare la fonte di infezione, davano esito negativo. La situazione si è andata normalizzando, elevando il grado di attenzione nell'applicazione delle barriere tra paziente e paziente e trattando quelli infetti con colistina. Dai dati ottenuti si può ipotizzare che la principale via di accesso di *A. calcoaceticus-baumannii complex* sia quella aerea. Inoltre la nostra esperienza dimostra l'importanza che in queste infezioni riveste la trasmissione per contatto, soprattutto in quei reparti per pazienti infetti lungodegenti e con elevata pressione antibiotica selettiva.

019

UN CASO DI SEPSI DA S. PNEUMONIAE POST-SPLENECTOMIA: RIFLESSIONI

Dono M.¹, Artioli S.², Amodeo C.³, Derchi A.³, Santini M.³,
Via F.¹, Roncella S.⁴, Battolla E.¹

¹ U.O. Analisi;

² U.O. Malattie Infettive;

³ U.O. Anestesia e Rianimazione;

⁴ U.O. Anatomia ed Istologia Patologica, Osp. S. Andrea, La Spezia.

Introduzione. Gli individui splenectomizzati risultano più vulnerabili alle sepsi causate da batteri capsulati. I sintomi iniziali spesso sono non-specifici e possono, in realtà, coincidere con danni fisiologici irreversibili. Infatti, il tasso di mortalità è molto elevato.

Noi riportiamo un caso di sepsi da *S. pneumoniae* in un paziente che ha subito una splenectomia circa 10 anni fa.

La presentazione di questo caso offre sia la possibilità di discutere il percorso diagnostico in emergenza sia lo spunto per una riflessione sulla prevenzione delle sepsi nei pazienti splenectomizzati.

Metodi. Il tampone faringeo di un paziente arrivato in pronto soccorso (PS) con rush cutaneo, viene inviato in urgenza in laboratorio per la colorazione GRAM. Viene rilevata la presenza di rarissimi diplococchi GRAM positivi.

Successivamente, su segnalazione di questo referto, viene inviato al laboratorio un campione di urina per l'analisi dell'antigene pneumococcico che risulta fortemente positivo.

Risultati. Un paziente di 43 anni arriva in PS con una grave compromissione multiorgano. I tests di laboratorio sono compatibili con una sepsi da *S. pneumoniae* in paziente splenectomizzato. I livelli elevati di procalcitonina (>10 ng/ml) confermano la sepsi severa. La TAC toracica rivela piccoli focolai multipli in entrambi i polmoni, di probabile origine pneumococcica.

Conclusioni. La prevenzione per il management degli indi-

vidui senza milza comprende: la vaccinazione, la profilassi antibiotica e l'informazione dei pazienti.

Tuttavia, nonostante sia molto importante ridurre il rischio di sepsi in tali pazienti, in pratica queste misure preventive non vengono quasi mai proposte. Infatti, il nostro paziente, non consapevole di essere un individuo ad alto rischio di sepsi, aveva ignorato i pochi segnali che la polmonite pneumococcica aveva dato. E' molto importante allora, coinvolgere i pazienti sul rischio settico dopo la splenectomia soprattutto con l'informazione (e l'aiuto del clinico); inoltre, nel caso di una sospetta sepsi, è fondamentale l'anamnesi del paziente per improntare un percorso diagnostico mirato, soprattutto in urgenza.

020

VALUTAZIONE DEL NUOVO SISTEMA AUTOMATICO "VIDIA" PER LA RICERCA DI ANTICORPI ANTI TOXOPLASMA E ROSOLIA

Ferraironi M., Martinelli D. e Cipriani P.

Il Facoltà di Medicina e Chirurgia Università La Sapienza Roma - Servizio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Andrea, via di Grottarossa 1035, 00189 Roma

Introduzione. Il sistema VIDIA (bioMérieux) è un nuovo strumento automatico con gestione della provetta primaria, concepito per semplificare la routine e per implementare il livello di rintracciabilità dei dati.

Nel presente lavoro abbiamo valutato le performance dei test VIDIA per gli anticorpi anti-Toxoplasma ed anti-Rosolia confrontandola con il sistema attualmente in uso nel nostro laboratorio AxSym - Abbott.

Metodi. Sono stati analizzati complessivamente 200 campioni appartenenti ad una popolazione mista, per determinare TOXO IgG e IgM, e RUB IgG e IgM. I campioni con risultati discordanti sono stati ripetuti con il metodo VIDA e, inoltre, sono previsti ulteriori approfondimenti utilizzando il test di riferimento Toxo Isaga.

È stata inoltre valutata la ripetibilità intra-serie e la riproducibilità inter-serie del test VIDIA TOXO IgG e VIDIA RUB IgG secondo i suggerimenti dell'NCCLS, utilizzando 2 pool di sieri a 4 diverse concentrazioni.

Risultati. Globalmente si è riscontrata una prevalenza pari a circa il 19% per Toxo IgG, il 3% per Toxo IgM, il 77% per Rosolia IgG e l'1% per Rosolia IgM.

La concordanza tra i metodi a confronto è stata del 100% per il Toxo IgG, 98% per Toxo IgM, 99% per Rosolia IgG e 99% per Rosolia IgM.

Sui risultati discordanti sono in corso approfondimenti diagnostici per stabilire se tale discordanza sia da imputare solo al metodo usato o possa dipendere anche dallo stato immunologico dei pazienti soprattutto se si tratta di donne in gravidanza.

La precisione intra-serie e la ripetibilità inter-serie (CV%) dei test VIDIA TOXO IgG e VIDIA RUB IgG erano comprese tra 2 e 4% circa.

Conclusioni. Dai risultati emerge un elevato livello di concordanza tra il sistema VIDIA e il metodo AxSym attualmente in uso. Si rileva inoltre un elevatissimo grado di precisione intra-serie ed inter-serie dei test VIDIA.

021

LEPTOSPIROSI CON ISOLAMENTO CULTURALE POSITIVO

Franzin L.¹, Cabodi D.¹, Ciarrocchi S.², Pinto A.², Ciceroni L.²

¹ Laboratorio "Ricerca Speciale Microbiologica", Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, Ospedale Amedeo di Savoia, Corso Svizzera 164, 10149 Torino.

² Centro Nazionale per le Leptospirosi, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

Introduzione. Leptospirosi è una malattia di difficile diagnosi di laboratorio. L'esame culturale fornisce una prova diretta e definitiva dell'infezione, non sempre ottenibile con esami sierologici. Nella leptospirosi a rapido decorso ed esito infausto la coltura è l'unico metodo in grado di consentirne la diagnosi. Inoltre la tipizzazione dei ceppi isolati è di rilevante importanza epidemiologica, in quanto permette di identificare il serovar infettante, di conoscerne la distribuzione geografica e talvolta di stabilire la sorgente di infezione o il reservoir animale. Riportiamo un caso di leptospirosi fulminante, diagnosticato con coltura, per il quale è stato definito il serovar infettante mediante tecniche di tipizzazione sierologica e molecolare.

Metodi. Paziente: soggetto maschio di 35 anni con febbre, ittero, insufficienza renale acuta, shock cardiocircolatorio. Circostanza presunta del contagio: caduta accidentale con automobile in un canale. Comparsa dei sintomi: una settimana dopo l'incidente. Penicillina G è stata somministrata dal 4° giorno dall'inizio dei sintomi. Il paziente è deceduto il giorno successivo. Metodi: La ricerca di anticorpi è stata eseguita su siero prelevato al 4° giorno di malattia mediante la reazione di agglutinazione microscopica (MAT) eseguita con 20 ceppi rappresentativi di 19 serovar e 14 sierogruppi. L'esame culturale è stato eseguito da sangue eparinato, da urina e da campioni autoptici (rene, polmone, milza, miocardio, fegato).

Risultati. La sierodiagnosi ha evidenziato anticorpi anti-*Leptospira* 1:320 verso il serovar Poi. La coltura è risultata positiva da sangue e da urina. Entrambe gli isolati sono stati identificati come serovar Icterohaemorrhagiae (sierogruppo Icterohaemorrhagiae) mediante MAT eseguita con antisieri di coniglio ed anticorpi monoclonali. I risultati della tipizzazione sierologica sono stati confermati mediante analisi del DNA genomico eseguita con PFGE.

Conclusioni. I risultati ottenuti confermano l'importanza dell'esame culturale nella diagnosi di leptospirosi e che solo attraverso la tipizzazione degli isolati è possibile identificare con certezza il serovar di appartenenza della leptospira infettante.

022

METODO COLTURALE PER L'ISOLAMENTO DI MYCOBACTERIUM ABSCESSUS E MYCOBACTERIUM CHELONAE DALL' ESPETTORATO DI PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Garlaschi M.L.², Cariani L.¹, Marchi M.¹, Costantini D.¹, Colombo C.¹, Clarizia G.², Laricchia L.¹, Russo M.¹, Torresani E.²

¹IRCCS O.M. Policlinico, MaRe - Centro di Fibrosi Cistica, Via F. Sforza 28, 20122 Milano.

²IRCCS O.M. Policlinico, MaRe - U.O. di Pat. Clinica e Microbiologia, Via F. Sforza 28, 20122 Milano.

Introduzione. I micobatteri a rapida crescita (RGM) solo occasionalmente sono causa primaria di malattia nell'uomo. Nei soggetti affetti da fibrosi cistica (FC), a causa della persistente patologia ostruttiva delle vie aeree, è maggiore il rischio di sviluppare infezioni da RGM. L'aumento di prevalenza di *Mycobacterium abscessus* e *Mycobacterium chelonae* nella popolazione con Fibrosi Cistica e la loro implicazione nella malattia cronica polmonare, ci hanno indotto ad attivare specifici programmi di sorveglianza.

Scopo. L'osservazione occasionale che gli RGM crescono sul terreno selettivo generalmente utilizzato per isolare *Burkholderia cepacia* complex (BCSA), ci ha indotti a verificare se tale terreno possa essere utilizzato per isolare *M. abscessus* e *M. chelonae* dall'espettorato di pazienti con Fibrosi Cistica.

Pazienti e Metodi. Nel periodo 01/03/2005-31/03/2006), è stato effettuato l'esame colturale di 1500 campioni di espettorato provenienti da 500 pazienti FC secondo procedure standard. Le piastre di BCSA, seminate, dopo fluidificazione, con 100 µl di campione, sono state incubate aerobicamente a 37°C per 72 ore e successivamente incubate a temperatura ambiente per altri 10 gg. Su ogni nuovo lotto di terreno è stato eseguito il CQI, mediante utilizzo di 2 ceppi ATCC: *M. abscessus* ATCC 23004 and *M. chelonae* ATCC 35752. Tutte le colonie suggestive per RGM sono state riseminate su agar sangue e identificate a livello di specie, usando una PCR specie-specifica per i Micobatteri (GenoType Mycobacterium CM; Hain, Nehren, Germany, distribuito dalla Ditta Arnika). Il test è basato su una ibridazione inversa, atta a rilevare un prodotto di amplificazione di un frammento di circa 230 pb all'interno del gene 23 S rRNA.

Risultati. Dopo 13 + 3 gg di incubazione compaiono piccole colonie, non pigmentate, lisce e/o rugose, dal tipico odore di "cantina". Tutti i 50 ceppi sospetti per RGM, isolati dall'espettorato di 27 pazienti FC (5.4%), furono geneticamente confermati dal test GenoType Mycobacterium CM. 19 pazienti erano colonizzati con *M. abscessus* e 7 con *M. chelonae*.

Conclusioni. L'osservazione che gli RGM crescono sul terreno selettivo per *B. cepacia* complex, ci permette di ricavarli in tutti i campioni con un metodo estremamente semplice e poco costoso. E' comunque auspicabile effettuare un test di biologia molecolare per identificare gli RGM a livello di specie.

023

USO DI UN TEST SALIVARE PER IDENTIFICARE SOGGETTI A RISCHIO DI CARIE

Gatti M., Almeria M., Rizzati T.G.,

Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Sez. di Microbiologia, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna, Via S. Vitale 59, 40125 Bologna.

Introduzione. Lo sviluppo di lesioni cariose su tutte le superfici dentali coinvolge diverse specie batteriche che si succedono col variare delle condizioni dell'ambiente.

Numerosi studi hanno permesso di evidenziare una forte associazione tra carie dello smalto e presenza di *S. mutans*, mentre *S. mutans* e lattobacilli sono stati riscontrati nella carie radicolare. Scopo del presente lavoro è stato quello di individuare, tramite l'uso di un test salivari, eventuali soggetti a rischio di carie per poter prevenire e ridurre nuovi casi di malattia nella popolazione prima che le lesioni si rendano apprezzabili all'esame clinico.

Metodi. Sono stati reclutati 53 pazienti (studenti universitari) di età compresa tra 20 ed 46 anni, con una età media di 23 anni, appartenenti sia al corso di laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria, sia al corso di laurea in Igiene Dentale.

L'analisi era finalizzata alla ricerca della carica batterica in cfu/ml di saliva di *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp, responsabili con altri fattori, dell'insorgenza della lesione cariosa.

Il protocollo di ricerca prevedeva le seguenti fasi: raccolta di materiale patologico (saliva), esame colturale, utilizzando slide del commercio CRT bacteria (Ivoclar) composto da due terreni: Mitis-salivarius-agar per la crescita di *S. mutans* e Rogosa agar per la crescita di *Lactobacillus* spp, il tutto veniva incubato a 37°C per 48 ore.

Dalle colonie crescite si sono allestiti vetrini colorati con Gram ed isolamenti su piastre di agar sangue di cavallo (Biolife) ed incubate a 37°C per 48 ore in aerobiosi per gli streptococchi, mentre per i lattobacilli gli isolamenti venivano incubati in aerobiosi ma anche in anaerobiosi utilizzando il sistema GENbag (bioMérieux) fino ad ottenere colture pure. L'identificazione di specie avveniva utilizzando i sistemi biochimici del commercio API 20A (bioMérieux) per i lattobacilli e API 20 Strep (bioMérieux) per gli streptococchi.

Risultati. Per quanto riguarda la ricerca di *S. mutans*, su 53 campioni 38 sono risultati con una carica < 10³ cfu/ml, 8 con carica batterica compresa tra >10³ e < 10⁵ cfu/ml, mentre 7 con una carica > di 10⁵ cfu/ml. Per i lattobacilli i risultati sono stati: su 53 campioni studiati, 21 avevano una carica <10³ cfu/ml, 16 avevano una carica compresa tra >10³ e < 10⁵ cfu/ml, mentre 16 avevano una carica batterica alta, > 10⁵ cfu/ml. L'identificazione biochimica dei lattobacilli ha evidenziato la presenza di 3 specie diverse: *L. acidophilus* (62,5%), *L. fermentum* (25%) e *L. jensenii* (12,5%).

Conclusioni. I dati ricavati con questo test non sono da soli sufficienti a definire un individuo a rischio o meno di carie, perché essi vanno sempre correlati con altri parametri: igiene orale, alimentazione, predisposizione individuale, ecc. Ci sono, a nostro avviso, condizioni nelle quali il test è utile come indice predittivo di rischio carie soprattutto a livello pediatrico in modo da adottare misure preventive precoci.

024

ENDOFTALMITI ED ASCESSI OCULARI: COLTURA SU BACTEC 9000 IN CONFRONTO AI TERRENI TRADIZIONALI

Giardini F.¹, Bay A.², Vana M.¹, Pollino C.¹¹Laboratorio Analisi ASL I Ospedale Oftalmico Torino²Divisione Glaucomi ASL I Ospedale Oftalmico Torino

Introduzione. La massiccia terapia antibiotica locale, in pazienti affetti da infezioni oculari a prognosi severa, ha prodotto, nella nostra esperienza di anni, deludenti risultati dell'esame colturale. Il sistema Bactec, che prevede l'utilizzo di flaconi Ped Plus a basso volume di inoculo con resine attive nella neutralizzazione degli antibiotici presenti nel campione, è stato adattato alle nostre procedure di laboratorio per campioni oculari.

Metodi. Il nostro studio prende in esame 64 casi di infezioni oculari a prognosi severa, verificatisi nell'arco di 14 mesi, così ripartiti: 43 endoftalmiti (sia post-traumatiche che post-chirurgiche), 21 ascessi oculari.

50% dei campioni costituita da umor vitreo o acqueo, di 0.1-0.3 ml di volume, trasportati in laboratorio con il sistema Port-A-Cul; la restante parte costituita da tamponi Transport-Cult prelevati sulle lesioni oculari.

I materiali sono stati seminati ed incubati su:

- 1) Terreni solidi - agar cioccolato, agar sangue, incubati in aerobiosi a 37°C fino a 72 ore, agar cioccolato e baci-tracina, incubato in capnofilia fino a 72 ore.
- 2) Terreni liquidi - brodo cuore cervello 9ml, flaconi Hemoline difasico, incubati a 37°C in aerobiosi fino a 7 giorni.
- 3) Flaconi Bactec Ped Plus incubati a 35°C nel sistema Bactec 9050 con protocollo 7 giorni.

In caso di crescita nei terreni solidi e liquidi, i germi isolati sono stati identificati con il sistema API.

Risultati. Dei 64 campioni da endoftalmiti ed ascessi oculari, 42 sono risultati positivi alla coltura su Bactec; di questi, solo 14 campioni sono risultati positivi anche alla coltura con Hemoline, nessuno solo su Hemoline. Il brodo cuore cervello ha dato crescita in soli 11 casi, sempre confermati da Hemoline e Bactec positivi. I terreni solidi hanno dato crescita in soli 9 casi, sempre confermati da Hemoline e Bactec positivi.

Il tempo medio di positivizzazione per i flaconi Bactec è stato di 16.5 ore, mentre quello degli altri terreni è stato di 36 ore.

Conclusioni. Il significativo aumento di positività rispetto alla coltura tradizionale, realizzato attraverso l'adozione del Sistema Bactec 9000, ha permesso di migliorare notevolmente in sensibilità e in rapidità la diagnosi delle infezioni oculari a prognosi severa.

025

SIFILIDE CONNATALE: DIAGNOSI DI LABORATORIO

Grisolia V., Roscetto E., Scognamiglio R., Del Pezzo M.A., Di Costanzo P.*, Piccoli S., Avagliano G., Rossano F.

Area Funzionale di Diagnostica Microbiologica -

A. O. U. Federico II

*Terapia Intensiva Neonatale - A. O. U. Federico II

La sifilide, malattia a prevalente trasmissione sessuale, ha fatto registrare recentemente un significativo aumento di nuovi casi, soprattutto in donne in età fertile (+ 59% dal 1986 al 1989) con conseguente aumento di forme congenite.

Dal gennaio 2005 a tutt'oggi, abbiamo esaminato complessivamente 140 sieri di pazienti, 48 dei quali di neonati con sospetto di sifilide. Dei 48 sieri testati per sierologia treponemica, 19 sono risultati positivi (alti titoli di RPR e TPHA, presenza di immunoglobuline specifiche di classe IgG).

Alla nascita, nessuno dei 19 neonati sieropositivi mostrava segni clinici di sifilide: prematurità, basso peso alla nascita, epatomegalia con o senza splenomegalia, rash cutaneo vescicoloso, pseudoparalisi, distress respiratorio, emorragia, febbre; mancavano lesioni bilaterali e simmetriche delle ossa lunghe (femore e omero), rilevabili radiograficamente, considerate patognomiche per la sifilide. Tutti i 19 neonati al momento del ricovero, venivano sottoposti a terapia con diaminocillina 1.200.000 U.I. i.m./ settimana per tre settimane e monitorati periodicamente per i parametri sierologici treponemici: ogni mese per tre mesi, dopo sei mesi e dopo un anno. A negativizzazione delle IgG specifiche e a riduzione di almeno 4 volte dei titoli di TPHA e RPR, 6 bambini sono stati dichiarati non infetti da sifilide. L'aumento del titolo delle IgG specifiche e la permanenza dei valori di TPHA e RPR ha consentito di porre diagnosi di infezione per 2 bambini, i quali sono stati sottoposti a terapia specifica e monitorati per il follow-up terapeutico. È ancora in corso il monitoraggio sierologico per i rimanenti 11 bambini.

In conclusione i test sierologici antitreponemici risultano efficaci sia ai fini della diagnosi, sia per il follow-up terapeutico fino a negativizzazione della sierologia treponemica e comunque per non meno di 12-18 mesi, lì dove la diagnosi non può essere supportata da parametri clinici di certezza.

026

ANALISI GENICA DI CEPPI DI MRSA: CONFRONTO TRA POLIMORFISMO DEL GENE *spa* E PFGE

Grossato A.¹, Bettanello S.², Boldrin C.¹¹Dipartimento Istol.-Microbiol.-Biotec. med., Università di Padova;²Laboratorio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera di Padova

Introduzione. La diffusione dell'antibiotico-resistenza tra *S.aureus* rende problematico il trattamento delle infezioni stafilococciche. In Italia l'isolamento di *S. aureus* meticillino-resistenti (MRSA) ha superato la percentuale del 40% sul totale degli isolati. Il monitoraggio e la limitazione della diffusione di MRSA in ambito sia ospedaliero che extra-ospedaliero richiedono sistemi di tipizzazione rapida ma attual-

mente per MRSA il “gold standard” della caratterizzazione è rappresentato dalla PFGE, una tecnica complessa e di non rapida esecuzione. In questo studio abbiamo confrontato i risultati di tipizzazione con PFGE con l’analisi del polimorfismo del gene *spa*. Tale gene, codificante per la proteina A di superficie, possiede una regione polimorfica X formata da un numero variabile di *repeats* di 24 bp.

Metodi. 80 ceppi di MRSA, isolati all’Ospedale di Padova, furono identificati tradizionalmente e con API ID32 staph. I profili di antibiotico-resistenza furono tracciati utilizzando Vitek -2. Saggi di PCR furono allestiti per evidenziare il gene *mecA* e per la tipizzazione del polimorfismo del gene *spa* (seguita da determinazione delle dimensioni degli ampliconi). I profili di PFGE furono ottenuti, dopo digestione con *Sma* I, alle seguenti condizioni: 6 V/cm, 22 ore, 14°C, tempi di switch 5-35s, angolo 120°.

Risultati. Tutti i ceppi MRSA da noi esaminati erano *mecA* positivi e multiresistenti. Tra gli 11 antibiotipi osservati quello predominante (resistente a beta-lattamici, eritromicina, gentamicina, tetraciclina, chinoloni, rifampicina) comprendeva il 55% degli isolati. Dall’analisi della regione X del gene *spa* si individuavano 9 tipi di ampliconi, con dimensioni variabili da 226 a 418 bp. Il tipo con amplicone di 418 bp comprendeva il maggior numero di ceppi simili o correlati, in base all’analisi eseguita mediante PFGE.

Conclusioni. L’esame del polimorfismo degli ampliconi del gene *spa* appare utile come *screening* preliminare di ceppi di MRSA potenzialmente correlati, che devono essere poi esaminati mediante PFGE, a scopo epidemiologico.

027

PRESENZA DI *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* IN PLACCHE ATEROSCLEROTICHE MEDIANTE REAL TIME PCR

Grosso S.¹; Lucini V.¹; Pannacci M.¹; Malandrin S.²; Scaglione F.¹

¹Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Via Vanvitelli 32, 20129 Milano.

²Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Fatebenefratelli e Oftalmico, 20121 Milano.

Introduzione. Recenti studi suggeriscono che diversi microrganismi gram negativi, tra cui *Chlamydomphila pneumoniae* potrebbero essere implicati nello sviluppo e nella progressione dell’aterosclerosi. In questo studio abbiamo valutato la presenza del microrganismo intracellulare, in placche aterosclerotiche provenienti da aorta umana.

Inoltre, ipotizzando un possibile coinvolgimento nell’infezione da *C. pneumoniae* delle integrine, molecole di adesione implicate nell’aterogenesi e nel reclutamento delle cellule infiammatorie, abbiamo valutato l’eventuale colocalizzazione tra questo batterio e l’integrina $\alpha\beta_3$.

Metodi. Placche aterosclerotiche sono ottenute da 10 individui sierologicamente positivi a *C. pneumoniae* e di età compresa tra 43 e 76 anni sottoposti ad intervento per aneurisma. La presenza del microrganismo nei campioni prelevati è stata valutata sia mediante immunofluorescenza indiretta sia mediante estrazione del DNA e Real Time PCR.

Inoltre, la localizzazione di *C. pneumoniae* e di $\alpha\beta_3$ nelle

placche aterosclerotiche, è stata determinata con una tripla immunofluorescenza diretta.

Risultati. L’immunofluorescenza sulle sezioni di placche aterosclerotiche analizzate ha rilevato la presenza di *C. pneumoniae* in otto dei dieci pazienti arruolati mentre due benché sierologicamente positivi non hanno evidenziato, a livello della placca, il microrganismo. I dati ottenuti con la Real time PCR hanno confermato la presenza del patogeno.

L’immunofluorescenza tripla ha dimostrato come la presenza di *C. pneumoniae*, nelle placche aterosclerotiche analizzate sia evidente in cellule infiammatorie quali macrofagi e/o monociti che sulla loro superficie esprimono l’integrina $\alpha\beta_3$. Inoltre, le immagini ottenute al microscopio confocale hanno rilevato un “merging” tra $\alpha\beta_3$ ed il microrganismo.

Conclusioni. I dati ottenuti hanno confermato la presenza di *C. pneumoniae* nelle placche aterosclerotiche, e dimostrato come il patogeno si localizzi preferenzialmente a livello delle cellule macrofagiche. Inoltre, la colocalizzazione di $\alpha\beta_3$ con *C. pneumoniae*, osservata nelle placche analizzate avvalorava l’ipotesi che questa integrina possa essere coinvolta nello sviluppo e nella persistenza dell’infezione da *C. pneumoniae* favorendo così l’instaurarsi di patologie croniche come l’aterosclerosi.

028

CASO DI SEPSI DA *MORAXELLA CATARRHALIS*

Gualdi P., Collini L., Schinella M.,* Mucci G.

Laboratorio Patologia Clinica;

* U.O. Pediatria, Ospedale S. Maria del Carmine

- Ple S. Maria, 6, 38068 Rovereto (TN)

Introduzione. *Moraxella catarrhalis* è un cocco gram-negativo, commensale del cavo orale che a lungo è stato ritenuto dotato di scarso potere patogeno e che ora si sta affermando quale patogeno emergente nelle infezioni dell’albero respiratorio accanto a *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, in particolare nei soggetti con broncopatia cronica ostruttiva (BPCO).

Raramente causa infezioni invasive e nei bambini più spesso è agente eziologico di sinusiti e otite media.

Caso Clinico. Si riferisce il caso di un bambino di due anni giunto in Pronto Soccorso e successivamente trasferito presso l’Unità Operativa di Pediatria del nostro Ospedale con iperpiressia dal giorno precedente, cefalea e vomito.

In presenza di esami di laboratorio alterati; globuli bianchi $15.3 \times 10^9/L$, proteina C reattiva (PCR) 118.5 mg/L, VES 98 mm/h, e di focolaio basale alla radiografia toracica, per il sospetto clinico di infezione batterica, viene eseguito un prelievo per emocoltura.

Dopo l’esecuzione dell’emocoltura viene eseguita terapia con ceftriaxone in infusione venosa, con rapida risoluzione della sintomatologia e ripristino dei parametri di laboratorio.

Materiali e metodi. L’emocoltura si è positivizzata dopo circa 18 ore di incubazione a 37°C; al vetrino eseguito dal flacone sono stati evidenziati diplococchi Gram negativi e la ricerca di antigeni batterici è risultata negativa per *Neisseria meningitidis*. Dalle sottocolture eseguite in agar sangue e agar cioccolato, incubate in microaerofilia al 5% di CO₂ per 24 ore sono state isolate colonie piccole a “goccia di rugiada”, semitraslucide e ossidasi positiva.

La colorazione di Gram evidenziava diplococchi Gram negativi e l’identificazione biochimica, eseguita con gallerie Api-NH (bioMérieux), è risultata essere *M. catarrhalis*.

L'antibiogramma, eseguito su Muller Hinton sangue, ha dato risultati di resistenza a ciprofloxacina e sensibilità ad ampicillina, eritromicina, amoxicillina-acido clavulanico, cefaclor, ceftriaxone e trimetoprim-sulfametossazolo.

Conclusioni. Batteriemie causate da *M. catarrhalis* sono rare ma la frequenza tende ad aumentare in bambini immuno-compromessi. La letteratura riporta casi sporadici con fattori di rischio predisponenti. In tutti i casi sono presenti sintomi a carico delle vie respiratorie (otite media, sinusite e polmonite) con febbre.

Nel caso da noi presentato il soggetto, immunologicamente competente, manifestava alla Rx torace un quadro compatibile con infezione polmonare.

Presumibilmente l'agente causale era *M. catarrhalis*, isolata successivamente in campioni di sangue.

029

DNA-FINGERPRINTING DI STIPITI DI CHRYSEOBACTERIUM SPP ISOLATI DA PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Lambiase A., Del Pezzo M., Raia V.*, Sepe A.*, Iula VD., Testa A., Rossano F.

Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano" e Centro di Riferimento Campano per la Fibrosi Cistica - Dip. di Pediatria; Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II".

Chryseobacterium è un bacillo Gram-negativo non fermentante, normalmente riscontrabile in natura.

In pazienti affetti da Fibrosi Cistica (CF), l'isolamento di ceppi di Chryseobacterium non è ad oggi molto frequente. Nel contempo, però, è noto che in tali pazienti si verifica un'espansione dell'eziologia microbica responsabile di infezioni polmonari.

Obiettivi. Lo studio è finalizzato alla determinazione di vari aspetti riguardanti isolamenti batterici di Chryseobacterium spp, ottenuti da pazienti CF regolarmente seguiti presso il Centro di Riferimento Campano. In particolare è valutato:

- 1) La frequenza di isolamenti;
- 2) Il profilo di chemiosensibilità;
- 3) Il DNA-fingerprinting.

Materiali e metodi. Nel periodo gennaio 2003-dicembre 2005, i campioni biologici respiratori di pazienti CF sono sottoposti ad indagini microscopiche, colturali, biochimiche ed a studio della chemiosensibilità. Il DNA-fingerprinting è ottenuto con tecnica RFLP sfruttando la migrazione dei frammenti in campo elettroforetico pulsato (PFGE).

Risultati. Nel periodo in studio, sono stati isolati 26 ceppi (7 *C. meningosepticum*, 14 *C. indologens* e 5 *C. gleum*) da 17 pazienti.

Tali microrganismi hanno mostrato resistenza vs tutte le cefalosporine, compresa ceftazidime, e vs i carbapenemi. Qualche ceppo mostrava sensibilità nei confronti di ciprofloxacina, levofloxacina e trimetoprim-sulfametossazolo.

L'analisi della macrorestrizione ha fatto emergere una consistente eterogeneità fra ceppi.

Conclusioni. Sebbene attualmente il ruolo prognostico di Chryseobacterium in CF non sia del tutto chiaro e nonostante l'effettivo esiguo numero di isolamenti nel nostro campione, risulta comunque indispensabile assumere un atteggiamento di allerta nei confronti di tali reperti. La notevole resistenza

riscontrata nei nostri isolati determina un aumento della difficoltà di impostazione di trattamenti chemioterapici.

Dalla tipizzazione molecolare emergono chiaramente dati che non supportano l'evidenza epidemiologica di trasmissione paziente-paziente, come invece appare con ceppi del *Burkholderia cepacia complex*. Risulta comunque chiaro che lo studio della trasmissione di questo patogeno emergente necessita di approfondimenti, soprattutto per la comprensione delle sorgenti.

030

PREVALENZA DI STREPTOCOCCUS AGALACTIAE IN DONNE IN GRAVIDANZA

Lanzillotto C.¹, Guido M.², Rollo M.C.², Pizzileo G.¹, De Donno A.²

¹U.O. di Patologia Clinica del PO "San Giuseppe da Copertino", AUSL Le/I - via Carmiano, 73043 Copertino (LE).

²Laboratorio di Igiene, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali (Di.S.Te.B.A.), Università degli Studi di Lecce, via prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce.

Introduzione. La colonizzazione da *Streptococcus agalactiae* di gruppo B (GBS) intra-parto materna è un importante fattore di rischio di malattia ad esordio precoce nei neonati. La trasmissione perinatale avviene dopo l'inizio del travaglio e lo screening culturale della vagina e del retto a gravidanza inoltrata, può identificare donne a rischio.

Scopo della ricerca è quello di determinare la frequenza di isolamento di GBS su campioni vaginali e rettali di gravide (35^a-37^a settimana).

Metodi. Nel periodo 1-04-04 ed 30-06-05 sono stati analizzati per GBS c/o l'U.O. di Patologia Clinica di Copertino n°600 tamponi vaginali e rettali. I campioni sono stati sottoposti ad esame culturale (identificazione fenotipica dei ceppi).

Per valutare l'efficacia della profilassi antibiotica praticata su gravide risultate positive all'esame culturale, sono stati effettuati tamponi auricolari, rettali e faringei sui neonati.

La ricerca di GBS è stata effettuata mediante:

- isolamento su Agar sangue;
- identificazione dell'antigene polisaccaridico (agglutinazione al latte);
- identificazione biochimica;
- antibiogramma sui ceppi isolati ed identificati.

Risultati. Su 600 tamponi analizzati, 497(83%) sono risultati negativi e 103(17%) positivi. I tamponi positivi appartenevano per il 35% a donne (20-25aa) colonizzate a livello vaginale, per il 53% a donne (25-30aa) colonizzate a livello vaginale e rettale, e per il 10% a donne (30-35aa) colonizzate a livello rettale. Durante il travaglio le gestanti portatrici, sono state sottoposte a profilassi antibiotica endovenosa, con penicillina e/o ampicillina eliminando la trasmissione verticale di GBS e la sepsi neonatale (n=103).

Conclusioni. Non abbiamo osservato nessun caso di sepsi da GBS nei neonati da madri positive, ciò conferma che la profilassi antibiotica, riduce in maniera significativa la trasmissione verticale di GBS e la sepsi neonatale. L'incidenza riscontrata nel nostro nosocomio (17%) è in linea con quanto osservato in altri Paesi Europei (10%-20%).

In conclusione i dati ottenuti sottolineano l'importanza della prevenzione a cui le gestanti devono sottoporsi.

031

YERSINIA ENTEROCOLITICA: CASO DI BATTERIEMIA IN PAZIENTE TALASSEMICO

Lodolo L.¹, Bonfrate N.², Canale C.¹, Franzin L.², Grazioli V.¹, Mondino V.³, Rossi C.¹

¹S.C. Laboratori di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche
ASL 14 Piemonte- Presidio Ospedaliero di Verbania

²Laboratorio di "Ricerca Speciale Microbiologica"
dell'Ospedale Amedeo di Savoia - Torino

U.O.A. di "Malattie Infettive e Tropicali" Presidio

³Ospedaliero di Verbania - ASL 14 Piemonte

Introduzione. *Yersinia enterocolitica*, batterio Gram-negativo, della Famiglia delle *Enterobacteriaceae*, nell'uomo è essenzialmente causa di infezioni intestinali.

Tali infezioni, poco frequenti in Italia, interessano prevalentemente soggetti immuno-compromessi o con sovraccarico di ferro. Nei pazienti affetti da beta-talassemia, in terapia ferro-chelante con desferrioxamina, "Desferal", questa infezione si sviluppa infatti con estrema violenza.

Questo microrganismo utilizza infatti il ferro come importante fattore di crescita. La sintomatologia è quella di una malattia acuta con febbre di tipo settico, diarrea, dolori addominali.

Riportiamo un caso di sepsi da *Yersinia enterocolitica* in paziente affetto da talassemia major e cirrosi HCV correlata.

Metodi. Caso Clinico Paziente di 41 anni affetto da talassemia major, emocromatosi secondaria con ipogonadismo ipogonadotropo ed ipotiroidismo, cirrosi HCV correlata.

Il paziente, ricoverato al DEA e successivamente presso il reparto di Malattie Infettive del Presidio Ospedaliero di Verbania, riferisce insorgenza di febbre con brivido e diarrea. I dati di laboratorio evidenziano leucocitosi, aumento della PCR, alterazioni degli enzimi epatici.

Risultati. Le emocolture eseguite al ricovero (BACTEC 9120), sono risultate positive per bacilli Gram-negativi, evidenziati poi su agar MacConkey, con sviluppo di piccole colonie lattosio-negative, lisce, regolari, di un leggero rosa-pallido. Identificazione Biochimica ed l'Antibiogramma (MICROSCAN Walkaway - DADE Behring), hanno dato come risultato: *Yersinia enterocolitica* al 99%, resistente ad Ampicillina e Cefalosporine di I° gen.; dati confermati dopo reisolamento su Schiemann CIN agar.

Gli isolati, tipizzati presso il Laboratorio di "Ricerca Speciale Microbiologica" dell'Ospedale Amedeo di Savoia (TO), con test sierologici e metodi fenotipici, sono risultati di biotipo 4 e sierotipo 0:3; ceppo privo di siderofori e quindi spesso associato a terapia ferro-chelante. Marker di virulenza positivi in vitro.

Conclusioni. Isolamento ed identificazione in tempi rapidi di *Y. enterocolitica*, insieme alla immediata sospensione della terapia ferro-chelante e ad una terapia di associazione, cefalosporine e fluorochinolone, hanno consentito un rapido miglioramento del quadro clinico del paziente.

032

DIAGNOSI SIEROLOGICA DI BORRELIOSI DI LYME: VALUTAZIONE DI TRE EIA E TRE IMMUNOBLOT

Martelli P., De Luca R., Moratto A., Donadoni C., Mucignat L., Lazzarini D.*

S.O.S Immunologia clinica e Virologia,

Azienda Ospedaliera Santa Maria degli Angeli, Pordenone

* Euroimmun Italia

Introduzione. Nonostante i problemi che pone, la ricerca degli anticorpi anti *Borrelia burgdorferi* è un indicatore di primaria importanza per la conferma dell'infezione da *Borrelia burgdorferi*. L'approccio sierologico consigliato in Europa (MIQ2000) e in USA (CDC) è quello a due step: il primo prevede l'utilizzo di un test ELISA, il secondo, nel caso di risultati dubbi o positivi, di Westernblot o Immunoblot. Numerosi sono i kit in commercio che utilizzano, metodi, antigeni e criteri interpretativi diversi. Scopo di questo studio è la valutazione di alcuni di essi utilizzando sieri clinicamente caratterizzati.

Materiali. Ricerca di IgG e IgM con tre sistemi immunoenzimatici (EIA) (A-Euroimmun; B-Virion Serion; C-Sorin); due Western Blot per IgG e IgM (A -Euroimmun, B- Trinity), un Immunoblot per IgG e IgM (C- Genzyme Virotech).

Campioni. È stato utilizzato un pannello di 70 sieri da 4 Neuroborreliosi; 19 Eritemi migranti; 4 Artriti; 1 sospetta ACA; 19 donatori; 22 infezioni di altra natura

Risultati Sensibilità, specificità e VPP sono stati calcolati su base clinica.

EIA A	IgG+IgM	sens 94%,	spec 100%;	VPP 100%
EIA B	IgG+IgM	sens 96%,	spec 78%;	VPP 77%
EIA C	IgG+IgM	sens 94%,	spec 75%;	VPP 72%
WB A	IgG+IgM	sens 86%,	spec 100%;	VPP 100%
WB B	IgG+IgM	sens 82%,	spec 100%;	VPP 100%
IB C	IgG+IgM	sens 93%,	spec 95%;	VPP 93%

Conclusioni. I test di screening hanno dimostrato, come viene loro richiesto, una buona sensibilità, EIA B e C qualche problema di specificità e devono essere affiancati da test di conferma altamente specifici.

I test di conferma C ha fornito una buona sensibilità e specificità e un VPP accettabile, A e B hanno mostrato ottima specificità e VPP associati a una sensibilità accettabile in relazione alla loro funzione.

033

INFEZIONE DA LISTERIA MONOCYTOGENES IN GRAVIDANZA E SEPSI DEL NEONATO

Pascale F., Rondinelli V., Focarelli V., Saraceno R., Colosimo M., Giglio S., Pascale M.G., Iritano N., Caruso G., Marino A., Caligiuri F., Fabiano G., Dragone M., Mazzei U., Masciari R.

Virologia e Microbiologia Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio,
Presidio Pugliese, Via Pio X, 88100 Catanzaro

Introduzione. Le listerie sono bacilli pleomorfi Gram positivi, isolabili dal suolo, acque di scarico, numerosi alimenti e

dalle feci dell'uomo. *Listeria monocytogenes* causa infezioni di diversa natura, genericamente dette listeriosi che sono più frequenti nelle donne gravide e nei soggetti immunocompromessi.

Descrizione del caso. Un nato a termine da parto spontaneo presenta indice di Apgar 10 al primo ed al quinto minuto. La madre subito dopo il parto manifesta febbre a 40°C, resistente agli antipiretici, ma sensibile all'antibiotico terapia. A 18 ore di vita il piccolo viene trasferito in TIN per ingravescenze gemito espiratorio e ipertermia. Per la comparsa di episodi subentranti di apnea viene posto in CPAP con cannula nasofaringea. Gli esami ematochimici mostrano progressivo calo dei globuli bianchi, aumento della PCR, alterazione delle prove di coagulazione. In seconda giornata si evidenziano un esantema puntiforme non confluyente e secrezioni mucopurulente ad entrambi gli occhi. Per il grave distress respiratorio si rendono necessari l'intubazione ed il collegamento al respiratore meccanico. Nell'emocultura e nei tamponi nasale, congiuntivale e auricolare si apprezza la crescita in piastra di colonie simili a quelle di *S. agalactiae* ma catalasi positive. I vetrini predisposti evidenziano la presenza di cocco-bacilli Gram positivi, identificati successivamente come *Listeria monocytogenes*. L'antibiogramma consente la terapia specifica con amikacina e ampicillina mentre quella empirica era basata sull'uso di amikacina e cefalosporine, non efficaci sulle listerie. In quarta giornata si registra comunque l'exitus.

Conclusioni. Nelle donne gravide, alla 35^a - 37^a settimana di gestazione, deve essere effettuata la ricerca, su tampone vaginale, oltre che dello *Streptococcus agalactiae* (GBS), anche di patogeni meno comuni ma altrettanto temibili come le listerie. È auspicabile che il metodo di rilevamento rapido nel periodo intrapartum (PCR - 75 minuti) della colonizzazione da GBS nelle donne non precedentemente testate sia al più presto esteso alla ricerca di *Listeria monocytogenes*.

034

VALUTAZIONE DEL T-SPOT.TB PER IL FOLLOW-UP DELLA TERAPIA ANTITUBERCOLARE E PREVENTIVA

Piana F.^{1,2}, Codecasa L.R.², Baldan R.¹, Miotto P.¹, Ferrarese M.², Cirillo D.M.¹

¹Unità Batteri Patogeni Emergenti, Istituto Scientifico San Raffaele, via Stamira d'Ancona 20, 20127 Milano

²Istituto Villa Marelli, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Viale Zara 81, 20159, Milano

Introduzione. Recentemente sono stati proposti per la diagnosi della malattia tubercolare attiva e dell'infezione tubercolare latente (LTBI) nuovi test, basati sulla determinazione dell'interferon- γ prodotto dai linfociti T stimolati con antigeni specifici della tubercolosi (TB). T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford) ha dimostrato sensibilità e specificità migliori del test Mantoux. I risultati sono forniti in Spot Forming Cells (SFC), pertanto abbiamo valutato la possibilità di utilizzare questa caratteristica come parametro per la determinazione della risposta alla terapia antitubercolare e preventiva (PT).

Metodi. A tale scopo, abbiamo effettuato prelievi ematici da 14 pazienti con TB attiva e da 59 soggetti con elevato sospet-

to di LTBI prima dell'inizio della terapia appropriata (tempo 0) e a fine trattamento (tempo 6 o 12).

Risultati. Tutti i pazienti con TB e LTBI avevano un risultato del T-SPOT.TB positivo al tempo 0. In quattro pazienti con TB attiva è stato eseguito un'ulteriore determinazione dopo 2 mesi di terapia specifica: 1 paziente è risultato negativo, mentre 3 (75%) ebbero un incremento della conta di SFC.

I test eseguiti sui 14 pazienti con TB attiva al termine della terapia sono risultati negativi in 5 casi, mentre in 7 casi è stata osservata una diminuzione del numero degli spot ed in 2 pazienti l'incremento.

Nel gruppo di pazienti con LTBI, i test eseguiti a 6 mesi si sono rilevati negativi in 12 casi (20,3%), si è osservata una diminuzione del numero degli spot in 32 (54,3%), mentre si è assistito all'incremento in 10 (16,9%). In 5 casi (8,5%) la conta di SFC non è variata.

Conclusioni. Complessivamente, il 70% dei pazienti sottoposti a terapia ha avuto un decremento della conta degli spot o una negativizzazione del test, pertanto il T-SPOT.TB potrebbe diventare un mezzo per determinare la risposta alla terapia, soprattutto nei pazienti con LTBI, per i quali non è ancora disponibile un parametro biologico.

035

CONFRONTO DI DUE IFN- γ TEST NELLA RICERCA DELL'INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE NELLA POPOLAZIONE GENERALE E IMMUNOCOMPROMESSA

Piana F.^{1,2}, Codecasa L.R.², Miotto P.¹, Baldan R.¹, Ferrarese M.², Cirillo D.M.¹

¹Unità Batteri Patogeni Emergenti, Istituto Scientifico San Raffaele, via Stamira d'Ancona 20, 20127 Milano

²Istituto Villa Marelli, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Viale Zara 81, 20159, Milano

Introduzione. Due test commerciali, basati sulla determinazione dell'Interferon-gamma prodotto da linfociti T stimolati da specifici antigeni di *M.tuberculosis*, hanno ricevuto recentemente la licenza in Europa per la diagnosi della tubercolosi (TB) e dell'infezione tubercolare latente (LTBI): il T-SPOT.TB (Oxford-Immunotec) ed il QuantiFERON-TB GOLD In-Tube (Cellestis) (QFT). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la loro capacità di individuare i pazienti realmente infetti nella ricerca dei contatti di un caso di TB e di confrontare i risultati di entrambe con il test Mantoux (TST).

Metodi. Per tale ragione, abbiamo arruolato 121 contatti, 35 dei quali farmacologicamente immunosoppressi. Per quest'ultimo gruppo di pazienti, come suggerito dalle linee guida del QFT, la capacità dei linfociti di rispondere alla stimolazione è stata controllata utilizzando una provetta contenente del mitogeno.

Risultati. Negli 86 contatti immunocompetenti, il TST è risultato positivo in 60 (69,8%), il T-SPOT.TB in 35 (40,7%) ed il QFT in 39 (45,3%). Per la mancanza del controllo positivo del mitogeno in questo gruppo di pazienti, non è possibile determinare il reale numero di risultati indeterminati del QFT. Il T-SPOT.TB è stato indeterminato in 3 casi (3,4%). Nei 35 pazienti severamente immunocompromessi, il TST è risultato positivo in 5 pazienti (14,3%), il T-SPOT.TB in 9

(25,7%), mentre il QFT in 1 caso (2,8%). In questo gruppo la percentuale di indeterminati è stata del 14,3% circa per entrambe i test commerciali.

Conclusioni. Questi dati preliminari suggeriscono che l'utilizzo di un controllo positivo è cruciale nei pazienti gravemente immunodepressi e, nella nostra esperienza, il T-SPOT.TB sembra essere più sensibile in questo gruppo rispetto al QFT.

036

DATI PRELIMINARI SULL'ANTIGENICITÀ DELLA PROTEINA PGP3 DI *C. PSITTACI*

Pignanelli S.¹, Donati M.¹, Storni E.¹, Mazzeo C.¹, Magnino S.², Renzi M.³, Cevenini R.¹

¹DMCSS - Sez. Microbiologia, via Massarenti 9, 40138 Bologna

²IZSLER - Sez. Diagnostica di Pavia, strada Campeggi 61, 27100 Pavia

³IZSLER - Sez. Diagnostica di Bologna, via Fiorini 5, 40100 Bologna

Introduzione. *C. psittaci* è un batterio responsabile di un'ampia gamma di infezioni negli animali e di infezioni occasionalmente trasmissibili all'uomo (zoonosi). In questo studio è stata indagata l'antigenicità della proteina pgp3, proteina a codificazione plasmidica, mediante la dimostrazione di anticorpi specifici in corso di infezione.

Metodi. La risposta sierologica, nei confronti della proteina ricombinante pgp3 di *C. psittaci*, è stata studiata mediante la tecnica del Western Blot (WB). I sieri saggiati provenivano da 3 piccioni positivi all'isolamento di *C. psittaci* e da 220 piccioni indagati a caso. Inoltre è stato studiato 1 siero umano da paziente con polmonite atipica positiva all'isolamento di *C. psittaci*.

Risultati. Sono stati individuati anticorpi specifici anti-pgp3 sia nei sieri di piccione positivi all'isolamento di *C. psittaci*, sia nel 40% dei sieri di piccione prelevati a caso (88 su 220 sieri testati). Inoltre, il siero del paziente con polmonite atipica, reagiva con pgp3 di *C. psittaci*.

Conclusione. Dai dati preliminari ottenuti in questo studio, la proteina pgp3 si è dimostrata un antigene riconosciuto in corso di infezione attiva e comunque un marcatore di infezione (piccioni).

037

IDENTIFICAZIONE DI CEPPI DIVERSI DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IN PAZIENTI AFFETTI DA FIBROSI CISTICA

Pulcrano G.¹, Lambiase A.¹, Del Pezzo M.¹, Raia V.², Rossano F.¹

¹Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "Luigi Califano", Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Pansini, 80100 Napoli

²Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Pansini, 80100 Napoli

Introduzione. *Pseudomonas aeruginosa* (PA) è il patogeno che causa più dell'80% delle affezioni polmonari in soggetti affetti da Fibrosi Cistica. Tra i fattori di virulenza di PA ci sono i pili, fondamentali nell'interazione con le cellule dell'epitelio polmonare e composti da piline, subunità monomeri-

che di circa 15 kDa, codificate dal gene pilA. Il confronto delle sequenze amminoacidiche di piline estratte da ceppi diversi di PA ha evidenziato che la regione all'estremità N-terminale, coinvolta nell'assemblaggio del pilo, è fortemente conservata, mentre la regione C-terminale, coinvolta nell'interazione con i recettori eucariotici, è molto variabile. Anche l'operone della pilina presenta un'enorme variabilità genica: infatti in alcuni ceppi il gene pilA si trova strettamente a monte del gene tRNA-Thr, mentre in altri sono frapposte sequenze codificanti per proteine coinvolte nella biosintesi del pilo.

Lo scopo del lavoro è caratterizzare ceppi di PA isolati dagli espettorati di pazienti affetti da Fibrosi Cistica, colonizzati in modo cronico, sequenziando il gene pilA.

Metodi. Dai ceppi isolati è stato estratto il DNA genomico e il gene per la pilina è stato amplificato per PCR mediante l'impiego di due oligonucleotidi che cadono rispettivamente nella regione conservata al 5' del gene e a valle dello stesso gene nella regione del tRNA-Thr. I prodotti di PCR sono stati sequenziati.

Risultati. Nei ceppi analizzati sono stati evidenziati due prodotti di PCR di lunghezza differente, uno corrispondente alla lunghezza attesa per il gene della pilina (circa 500 bp) e l'altro di circa 1500 bp corrispondente alla lunghezza del gene pilA e un gene aggiuntivo. Gli amplificati di 500 bp sono stati sequenziati e in alcuni casi sono risultati identici al gene pilA del ceppo PAK, in altri casi simili al 90% al gene del ceppo PA103.

Conclusioni. Dai risultati preliminari si evince che i ceppi analizzati appartengono a gruppi filogenetici differenti.

038

CORRELAZIONE TRA STADIO DELL' INFEZIONE RESPIRATORIA CAUSATA DA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E LIVELLO SIERICO DI ANTICORPI SPECIFICI IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Roschetto E., Lambiase A., Del Pezzo M., Raia V., Ferri L., Gallè F., Rossano F.

Dip. Biologia e Patologia cellulare e Molecolare "Luigi Califano" e

¹Centro di Riferimento Campano per la Fibrosi Cistica

- Dip. di Pediatria, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II".

L'infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in pazienti con Fibrosi Cistica (FC) è un evento quasi inevitabile. La progressione del danno polmonare è imputabile non solo all'azione patogena del microrganismo, ma anche all'attività difensiva dell'ospite che, incapace di eliminarlo, auto-mantiene un processo di flogosi cronica. Nell'infezione da PA la produzione di anticorpi correla con la comparsa del morfotipo mucoide, la cronicizzazione dell'infezione e la severità della prognosi.

Obiettivi. Valutare in 100 pazienti afferenti al Centro FC Campano, la relazione tra stadio dell'infezione respiratoria causata da PA e livello della risposta anticorpale specifica.

Materiali e Metodi. La ricerca degli anticorpi anti-PA è eseguita mediante test ELISA che rivela anticorpi sierici contro elastasi, proteasi alcalina ed esotossina A.

Risultati. Tra pazienti con colture costantemente negative, il 69.8% è negativo all'esame sierologico, il 22.7% è risultato positivo (diluizione sierica 1:1000) e il 7.5% ha dato risultati border-line. Tra pazienti con colonizzazione sporadica, il 57.2% ha mostrato siero-negatività ed il 42.8% ha dato valo-

ri positivi. Tra pazienti con colonizzazione intermittente, il 50% è risultato siero-negativo e l'altro 50% siero-positivo. Nessuno dei pazienti con infezione cronica è risultato siero-negativo mentre si è avuto un risultato positivo nel 91% e un risultato border-line nel 9%.

Conclusioni. Il test applicato presenta una buona sensibilità permettendo l'identificazione di 91% dei pazienti con uno stato di infezione. La specificità è del 77.3% ma tale valore potrebbe essere più alto considerando che gli anticorpi anti-PA possono essere evidenziabili prima della positività colturale. La sierologia, quindi, sembra avere un valore addizionale nella rilevazione precoce di PA quando la densità batterica è troppo bassa per essere evidenziata mediante coltura dell'escreato. L'utilità clinica del test emerge sia ai fini diagnostici nell'individuazione tempestiva della presenza di una infezione polmonare, sia ai fini prognostici per avere informazioni sul decorso della malattia a livello respiratorio.

039

VALUTAZIONE DI UN METODO RAPIDO PER LA DIAGNOSI INFEZIONE DA *H.PYLORI* ATTRAVERSO RICERCA DI ANTIGENE FECALE

Gaibani P.¹; Pace A.¹; Cesari H.²; Sambri V.¹.

¹Sezione di Microbiologia, DMCS,
Università degli Studi di Bologna;
²Dyaset, Portomaggiore (FE).

Introduzione. L'infezione gastro-duodenale sostenuta da *Helicobacter pylori* è stata riconosciuta da almeno 20 anni come una delle cause principali della patologia dispeptica. Fra i diversi metodi microbiologici attualmente disponibili per la diagnosi di Laboratorio di infezione da *H.pylori*, la ricerca dell'antigene fecale ha assunto un ruolo preminente. Tale indagine si basa principalmente su tecniche immunoenzimatiche o immunocromatografiche.

Metodi. Oggetto della presente valutazione è stato un metodo immunocromatografico rapido per la ricerca dell'antigene fecale di *H.pylori* (DYASET). È stata valutata la sensibilità analitica di questo test mediante impiego di diluizioni scalari (da 1 mg/ml fino a 0.001 mg/ml) di una sospensione calibrata di *H.pylori* (ceppo CCUG 17874) in soluzione fisiologica, mediante apposizione di un volume totale di tale sospensione, per ciascun dispositivo, di 150 µl. Sono inoltre stati studiati 30 campioni di feci ottenuti da pazienti con diagnosi clinica di malattia dispeptica da *H.pylori* e risultati positivi al metodo immunoenzimatico (EIA) *Helicobacter pylori* antigene (ASTRA Diagnostici). Tutti i campioni fecali studiati col metodo immunocromatografico sono stati preparati sospendendo un volume pari ad almeno quattro grani di riso nella provetta contenente 1 ml di diluente del campione fornita col kit, agitando fino ad ottenere la completa dissoluzione della messa fecale e centrifugando la provetta secondo le istruzioni del produttore. L'età dei pazienti studiati variava da 10 mesi a 74 anni e la suddivisione per sesso era del 48.4% per il sesso femminile a del 51.6% per quello maschile.

Risultati. La valutazione della sensibilità analitica del test immunocromatografico ha dimostrato che questo metodo è in grado di identificare la presenza di antigene batterico fino ad una diluizione di 0.007 mg/ml. Tenuto conto del volume totale di sospensione applicata al dispositivo, la quantità minima di antigene identificabile in soluzione fisiologica è

pari a 1.05 µg. La concordanza fra il metodo EIA ed il test immunocromatografico studiati è stata del 90% (27 campioni positivi identificati dal test immunocromatografico contro 30 positivi quando testati col metodo EIA). I 3 campioni risultati negativi al test immunocromatografico sono stati saggiati con un secondo test EIA (DAKO) e sono stati confermati come positivi.

Conclusioni. I dati indicano che il test immunocromatografico rapido studiato può essere utilizzato, per la determinazione fecale di *H.pylori*, con risultati concordanti al 90% con il metodo EIA.

040

UTILIZZO DEL QUANTIFERON (QF)-TB GOLD IN UNA COORTE DI SOGGETTI PEDIATRICI E HIV POSITIVI

Sauzullo I.; Mengoni F.; Lichtner M.; Rossi R.; Ajassa C.; Rizza M.C.; Mastroianni C.M.; Vullo V.

Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali,
Università "La Sapienza" di Roma.

Introduzione. Nella diagnosi di infezione tubercolare il TST presenta bassa sensibilità e specificità in particolare nella popolazione pediatrica e nei pazienti HIV positivi. Nei soggetti HIV positivi l'immunodepressione determina una progressiva perdita della risposta immunitaria, producendo così possibili falsi negativi. Nella popolazione pediatrica tale diagnosi risulta indaginosa per la natura paucibacillare della malattia, a cui si aggiunge l'evenienza di malattia dovuta a micobatteri non-tubercolari. Numerosi studi hanno dimostrato l'affidabilità del test TB-Gold nella diagnostica dell'infezione tubercolare. A tutt'oggi ci sono pochi dati riguardanti i bambini e i pazienti HIV positivi.

Obiettivo dello studio. Valutare il ruolo del test TB-Gold in queste due diverse popolazioni.

Metodi. Sono stati analizzati 124 soggetti, 77 bambini (età 1-14 anni) e 47 HIV positivi. Il test TB-Gold (Cellestis), rileva la quantità di IFN-γ prodotta dai linfociti T stimolati con proteine specifiche: ESAT-6 e CFP-10.

Risultati. Dei 47 pazienti HIV positivi, 8 (17%) sono TB-Gold positivi (linfociti T CD4 Mediana±DS: **195±54 cell/mmc**), 24 (51%) negativi (**365±54**) e 15 (31%) indeterminati (**99±58**). Gli 8 pazienti TB-Gold positivi presentavano una tubercolosi attiva con conferma microbiologica/clinica. Nei 24 pazienti risultati negativi è stata successivamente diagnosticata una patologia non-tubercolare. In 15 pazienti il TB-Gold è stato indeterminato. Dei 77 bambini analizzati, 29 (37%) sono risultati positivi, di cui 21 con conferma microbiologica/clinica e 8 contatti; 27(35%) negativi e 21(27%) indeterminati.

Conclusioni. I nostri dati dimostrano il possibile utilizzo del TB-Gold nelle due popolazioni in studio. Nei pazienti HIV positivi l'analisi dei dati ha evidenziato che il risultato indeterminato del TB-Gold è correlato al basso numero dei CD4, mentre nella popolazione pediatrica è correlato anche all'età. I test indeterminati sono risultati compatibili con una risposta anergica e a differenza di un risultato negativo al TST non interrompono l'iter diagnostico, infatti in 6 HIV positivi e 3 bambini è stata successivamente diagnosticata un'infezione tubercolare.

041

SORVEGLIANZA DI MICRORGANISMI "SENTINELLA" ALL'OSPEDALE DI DESIO (MI) NEGLI ANNI 2000-2005

Solaro M., Cappellani A., Colombo L., Limonta G.,
Mocarelli P.

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

Introduzione. L'uso di antibiotici comporta, negli anni, un aumento di microrganismi resistenti alle terapie antimicrobiche, che producono disagi ai pazienti e costi aggiuntivi per il prolungamento della degenza.

Allo scopo di prevenire la diffusione di ceppi potenzialmente patogeni, l'Ospedale di Desio (MI) ha avviato, da alcuni anni, un programma di sorveglianza delle infezioni nosocomiali attraverso la tempestiva identificazione di "germi sentinella" e, a partire dall'anno 2004, ha aderito alla rete di sorveglianza SENTILOMB 1 avviata dal Coordinamento Regionale dei Comitati di Controllo delle Infezioni Ospedaliere della Regione Lombardia.

Scopo del nostro lavoro è stato valutare, negli anni, la prevalenza di microrganismi "sentinella" identificati dai campioni di pazienti ricoverati presso gli Ospedali di Desio e Seregno.

Metodi. Tra i "sentinella" segnalati nel periodo 2000-2005 dal Servizio di Medicina di Laboratorio dell'Ospedale di Desio, sono stati considerati: *S.aureus* meticillina-resistente (MRSA), Enterococchi vancomicina-resistenti (VRE), *C.difficile* tossigenico (CD-tox), *E.coli* e *K.pneumoniae* produttori di beta lattamasi a spettro esteso (ESBL).

È stata calcolata la prevalenza come % dei "sentinella" sui campioni positivi; la % di CD-tox è riferita al totale delle richieste. L'analisi statistica è stata effettuata con SAS versione 8.2.

Risultati. Nel periodo 2000-2005 la prevalenza di MRSA è scesa da 61.3% a 44.9% ($P_{fortrend} < 0.001$) e la prevalenza di CD-tox da 23.1% a 17.8% ($P_{fortrend} = 0.003$).

La prevalenza di VRE si è ridotta, senza raggiungere la significatività statistica, da 8.2% nel 2003 a 2.3% nel 2004.

La prevalenza di ESBL è aumentata da 3.8% nel 2000 a 6.6% nel 2005 ($P_{fortrend} = 0.025$).

Conclusioni. L'osservazione di microrganismi "sentinella" all'Ospedale di Desio mostra una riduzione nella frequenza di isolamento di MRSA, VRE e CD-tox, alla quale può aver contribuito la vigilanza messa in atto.

La crescita nell'isolamento di ceppi ESBL (concordante con la letteratura) è un fenomeno preoccupante, benché, all'Ospedale di Desio, la loro diffusione risulti ancora limitata.

042

CARATTERIZZAZIONE DI STIPITI DI *E. COLI* PRODUTTORI DI ESBL ISOLATI DA EMOCOLTURE

Nucleo E.¹, Spalla M.², Migliavacca R.¹, Daturi R.², Sacco L.²,
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, Italia.

Introduzione. *Escherichia coli* rappresenta, l'agente eziologico di batteriemie di più frequente riscontro. Come responsabile di setticemie, tale microrganismo è correlato principalmente a pielonefrite, condizioni di cateterizzazione, impiego di tecniche diagnostiche invasive, patologie a livello biliare ed intestinale. Si stima che una setticemia da *E. coli* comporti un tasso di mortalità pari circa al 10%.

Materiali e metodi. Nel periodo ottobre '05/gennaio '06 sono stati raccolti, presso il laboratorio di Analisi Microbiologiche dell'IRCCS San Matteo di Pavia, 38 stipiti di *E. coli* da emocolture provenienti da 33 pazienti ricoverati, prevalentemente, in reparti di medicina. La produzione di ESBL è stata rilevata sia mediante sistema Phoenix (Becton Dickinson) che test del doppio disco.

Per l'ulteriore caratterizzazione degli isolati ESBL-positivi sono stati effettuati esperimenti di isoelettrofocalizzazione (IEF), valutazione di attività idrolitica sui substrati, amplificazione genica, sequenziamento.

Risultati. Il 10% degli stipiti è risultato positivo per la produzione di ESBL mediante sistema automatizzato e test del doppio disco. Gli isolati, sempre sensibili alla associazione piperacillina-tazobactam, erano prevalentemente caratterizzati da una maggiore resistenza al cefotaxime che al ceftazidime, producevano un enzima con pI alcalino (circa 8.4), con attività idrolitica nei confronti di cefotaxime, ceftazidime, aztreonam e cefepime. È stata confermata, in tutti i ceppi con fenotipo caratteristico, la produzione di CTX-M 1.

Conclusioni. I risultati sottolineano la diffusione, anche a livello locale, della ESBL CTX-M 1. Solo se sistemi diagnostici per emocolture rapidi sono associati ad opportuni test di sensibilità *in vitro* atti ad individuare le resistenze dell'agente eziologico in causa, è possibile supportare efficacemente il clinico per la scelta di una corretta terapia.

043

EMOCOLTURE IN PAZIENTI ONCO-EMATOLOGICI: RISULTATI DI TRE ANNI DI OSSERVAZIONE.

Prignano G., Gallo M.T., Spinosi., Greco E., Giglio A.,
Moretto D., Stivali F., Belardi M., Donato K., Cilli L.,
De Santis A., Ensoli F.

S.C. Patologia Clinica e Microbiologia, Istituto San Gallicano,
IRCCS, Polo Dermatologico e Oncologico IFO,
via Elio Chianesi 53, 00144 Roma.

Introduzione. Lo studio presenta i dati relativi alla prevalenza delle sepsi in pazienti ricoverati nel nostro Istituto

mediante un'analisi retrospettiva dei dati ottenuti nel corso di tre anni.

Metodi. Sono state analizzate 3443 emocolture relative a tre anni di osservazione (dal 1 giugno 2003 al 31 maggio 2006). Il metodo utilizzato è il sistema Bact/Alert 3D 120 (bioMérieux). Dai flaconi risultati positivi sono stati allestite colorazioni di Gram da brodo/sangue, subculture in idonei terreni di coltura e identificazione microbica con antibiogramma e relative MIC con sistema Vitek 32 (bioMérieux). La tipizzazione dei lieviti è stata eseguita con metodo API 32 C (bioMérieux).

Risultati. Le emocolture positive sono state 965 (28.0% su 3443 flaconi esaminati). Delle 965 batteriemie riscontrate, 406 (42%) erano sostenute da stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS), 210 da Enterobatteri (119 ceppi di *Escherichia coli* + 88 ceppi appartenenti al gruppo KES + 2 ceppi di *Proteus spp.* e 1 di *Salmonella spp.*), 76 da lieviti ed, a seguire, 72 da *Pseudomonas spp.*, 45 da Enterococchi, 27 da Streptococchi ed altri.

Sono state riscontrate 29 sepsi polimicrobiche.

Inoltre sono stati isolati 75 ceppi di *Staphylococcus aureus*, di cui 25 (33.3%) erano meticillino-resistenti (MRSA), mentre, all'interno del gruppo degli Enterococchi, non si evidenziava nessun ceppo VRE (Enterococco vancomicina-resistente).

I lieviti erano rappresentati in prevalenza da *Candidae* non *albicans* (40 ceppi su un totale di 76).

Gli anaerobi erano presenti solo nello 0.9% dei positivi.

Conclusioni. Abbiamo riscontrato un quadro epidemiologico sovrapponibile a quello già descritto nell'ambito della realtà ospedaliera romana. Gli Stafilococchi (tutti gli Stafilococchi coagulasi-negativi e *Staphylococcus aureus*) continuano a rappresentare i microrganismi maggiormente riscontrati nei flaconi positivi e viene evidenziato un aumento delle batteriemie da Gram-negativi. Inoltre, nella nostra casistica relativa ai pazienti onco-ematologici, i lieviti si pongono al terzo posto fra i microrganismi rilevati.

044

ISOLAMENTO DI CHLAMYDIA TRACHOMATIS E DI MICRORGANISMI SESSUALMENTE TRASMISSIBILI IN PAZIENTI AFFERENTI ALL'AMBULATORIO DI MICROBIOLOGIA DEL POLO DERMATOLOGICO IFO

Spinosi O., Prignano G., Giglio A., Moretto D., Gallo M.T., Greco E., Stivali F., Belardi M., Donato K., Cilli L., De Santis A., Ensoli F.

S.C. Patologia Clinica e Microbiologia,
Istituto San Gallicano, IRCCS, Polo Dermatologico IFO,
via Elio Chianesi 53, 00144 Roma.

Introduzione. *Chlamydia trachomatis* è un microrganismo correlato a malattie sessualmente trasmissibili, quali uretriti, cerviciti, endometriti, salpingiti e PID, nella donna, e uretriti (a volte asintomatiche) nell'uomo. In questo studio è stata valutata la prevalenza delle infezioni da *Chlamydia t.* ed altre MST in una popolazione afferente all'Ambulatorio di Microbiologia del Polo Dermatologico IFO.

Metodi. Sono stati studiati 1124 pazienti (692 donne, tra i 16 e i 60 anni, e 432 uomini, tra i 18 e i 65 anni), di cui 214 extra-comunitari. I campioni pervenuti nel periodo giugno

2004-dicembre 2005, erano costituiti da cytobrush cervicale, uretrale o rettale, liquido seminale e urine per la ricerca di *Chlamydia t.* mediante metodo di ibridazione molecolare GENPROBE (bioMérieux). Sugli stessi campioni sono state anche eseguite: la ricerca microscopica di *Trichomonas*, la ricerca di germi patogeni e miceti mediante idonei terreni di coltura, la ricerca di micoplasmi uro-genitali con metodo Mycofast (DID), eventuale ricerca di *N. gonorrhoeae* con semina su Thayer-Martin e prove biochimiche effettuate con API NH (BioMérieux). In presenza di sintomatologia clinica sospetta, oltre ai test sierologici specifici, veniva effettuata la ricerca mediante PCR di *Treponema pallidum*-DNA e di HSV-DNA sul materiale prelevato dalla lesione ulcerativa.

Risultati. I pazienti risultati positivi per *Chlamydia t.* erano 87 (31 donne e 56 uomini), di cui 23 extracomunitari, con una percentuale del 7,7%. In 3 pazienti maschi omosessuali l'isolamento era effettuato da cytobrush rettale. Contemporaneamente all'infezione da *Chlamydia*, 8 pazienti presentavano infezione da *N. gonorrhoeae*, 1 infezione primaria da *T. pallidum*, 1 da *Trichomonas*, 4 da *Streptococcus agalactiae*, 14 da Micoplasmi e 6 da *Candida albicans*.

Conclusioni. La prevalenza di isolamenti di *Chlamydia t.* da noi riscontrata (7,7%) risulta più elevata rispetto a quella riportata nella letteratura italiana recente (3-4%) relativamente a popolazioni simili a quella da noi analizzata. Tale risultato potrebbe essere dovuto alla accuratezza dei prelievi che sono stati effettuati da specialisti Microbiologi che operano nell'ambito di un Ambulatorio dedicato. In conclusione, l'importanza di un corretto scraping uretrale o endocervicale che non potrà mai essere eseguito mediante autoprelievo, può essere alla base di una migliore efficienza di isolamento da *Chlamydia t.*

045

UN CASO DI INFEZIONE INVASIVA DA STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

Terragno M., Lanzillotto C.

Laboratorio di Patologia Clinica, S. Giuseppe da Copertino
AUSL/LE I

Metodi e caso clinico. Nel mese di settembre del 2005 veniva ricoverata presso il reparto di medicina del nostro nosocomio una donna di 75 anni affetta da diabete scompensato, con febbre da 3 giorni associata ad astenia, irritabilità e rigidità nucale. Dall'anamnesi risultava che già 20 giorni prima del ricovero erano comparsi dolori lombosacrali e febbre elevata, che trattati a domicilio con antinfiammatori ed antibiotici, avevano determinato la remissione della febbre, ma non dei dolori.

Veniva ricoverava, pertanto, con il sospetto diagnostico di meningite e richiesti i seguenti esami:

emocromo (RBC 3.860.000, PLT 250.000, WBC 8100 Neu.82 Linf.12 Mon.6), VES 1h 103, PCR 19, FBG 520.

Sottoposta a puntura lombare, il materiale pervenuto presentava un'aspetto purulento, ed essendo insufficiente per eseguire l'esame chimico fisico, si procedeva pertanto con la ricerca microbiologica. All'esame microscopico, il vetrino colorato con GRAM evidenziava cocco-bacilli GRAM+ ed un gran numero di neutrofili. Dato l'aspetto francamente purulento, veniva effettuata la semina in aerobiosi, CO2 ed anaerobiosi.

Risultati. Dopo 24 ore, erano presenti sulle piastre di Agar Sangue, piccole colonie grigiastre con zona di beta -emolisi intorno, che alla ricerca antigenica risultavano positive per lo streptococco gruppo B. L'identificazione biochimica eseguita con sist.API della Ditta bioMérieux, evidenziava la presenza di *Streptococcus agalactiae*.

La paziente, veniva trasferita in Malattie Infettive, dove il sospetto di meningite non veniva confermato, ma sottoposta ad ulteriori accertamenti (RNM) si evidenziava l'esistenza di un ascesso epidurale localizzato tra D10 ed L5.

Trattata con terapia antibiotica mirata, dopo 25 giorni veniva dimessa guarita.

Conclusioni. Riteniamo che la condizione di scompenso diabetico cronico ha favorito l'insorgenza di questa infezione invasiva sostenuta da *Streptococcus agalactiae*.

046

VALUTAZIONE DI UNA METODICA RAPIDA PER L'ESECUZIONE DELL'ANTIBIOGRAMMA DIRETTO DA EMOCOLTURA

Maffei M., Lemmi Casini M., Usiglio D., Lanata M., Chisci R., Sansone P., Mori M.

Struttura Complessa Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche
E.O.Ospedali Galliera
Mura delle Cappuccine 14 - 16128 Genova

Introduzione. Ad oggi non esiste un protocollo standardizzato che permetta di eseguire un antibiogramma direttamente dai flaconi per emocolture positivi. Si è cercato perciò di individuare una metodica semi automatizzata che dia risultati rapidi per Identificazioni e Antibigrammi per anticipare il risultato di 24h.

Metodi. È stata studiata una popolazione totale di 75 ceppi: 40 Gram positivi e 27 Gram negativi da casi clinici, e 8 ceppi con meccanismi di resistenza noti per allestire emocolture simulate. I ceppi sono stati isolati da flaconi di emocolture positive BacT Alert (bioMérieux) con due metodiche: centrifugazioni sequenziali o centrifugazione su gel separatore. I ceppi arricchiti sono stati analizzati con il sistema Phoenix (Becton Dickinson) per l'esecuzione di identificazione e antibiogramma. Ogni emocoltura è stata processata sia con metodica classica, secondo le linee guida CLSI che con metodica sopra descritta per poter confrontare i risultati.

Risultati. La prima metodica è stata applicata su 43 ceppi batterici evidenziando un errore del 31,8% nelle Identificazioni, prevalentemente a carico dei Gram positivi. Tali errori sono stati eliminati con la seconda metodica introducendo l'uso di gallerie API (bioMérieux) solamente per l'Identificazione dei ceppi Gram positivi. Su 1166 ABG gli errori totali sono stati 39 (3,34%); per i Gram positivi: 6 very major, 3 major e 16 minor error; per i Gram negativi: 1 major e 13 minor error. Particolari meccanismi di resistenza sono stati correttamente individuati sui ceppi di controllo.

Conclusioni. La metodica studiata si è rivelata accettabile nell'anticipare di 24h i risultati.

In considerazione dei costi complessivi, ne riteniamo utile l'impiego per casi selezionati.

047

POLMONITE DA STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IN ETÀ PEDIATRICA: ESAME CULTURALE DELL'ASPIRATO NASO FARINGEO E AG URINARIO

Zambolin M.¹, Cavallaro A.², Scarin M.², Andreola B.¹, Da Dalt L.¹

¹Dipartimento di Pediatria Università di Padova

²Istituto di Microbiologia-Virologia Ospedale - Università di Padova

Introduzione. *Streptococcus pneumoniae* è, fra i batteri, quello più frequentemente responsabile di polmonite acquisita in comunità in età pediatrica^{1,2}. A causa della potenziale gravità delle forme di polmonite pneumococcica e delle loro complicanze è fondamentale arrivare a una diagnosi eziologica per impostare una corretta terapia. Nel nostro studio abbiamo valutato i risultati ottenuti dalla ricerca di *S. pneumoniae* realizzata con 2 metodi, l'esame culturale dell'aspirato nasofaringeo (Anf) e la ricerca dell'antigene solubile di *S.pneumoniae* (Ag-S.p.) nelle urine, allo scopo di confrontare i due metodi diagnostici.

Materiali e metodi. Studio di tipo prospettico osservazionale (gennaio-settembre 2005) su 44 bambini di età compresa tra 1 mese e 15 anni, pervenuti al Pronto Soccorso della Clinica Pediatrica di Padova e risultati affetti da polmonite radiologicamente confermata, sospettata sulla base dei dati clinico-anamnestici. L'esame culturale dell'aspirato nasofaringeo è stato eseguito su Agar Columbia 5% sangue montone in atmosfera arricchita di CO₂ al 9%. Dopo 24-48 ore le colonie α emolitiche sospette per *S.pneumoniae* sono state sottoposte alla prova dell'optochina e della solubilità in bile; se positive si allestiva l'antibiogramma. Contemporaneamente si è proceduto alla ricerca su urine dell'antigene C-polisaccaridico di *S.pneumoniae* tramite un test rapido immuno-cromatografico (NOW *S.pneumoniae*, Binax)

Risultati. L'antigene urinario è risultato positivo in 17 casi (39%) e negativo in 27 casi (61%). L'aspirato nasofaringeo è risultato positivo in 13 casi (29,5%) e negativo in 31 casi (70,5%).

	Anf+	Anf-	Totale
Ag S.p.+	8	9	17
Ag S.p.-	5	22	27
	13	31	44

Dei 9 casi con Ag-S.p.+ e Anf-: tutti presentavano leucocitosi e di questi 6 (66,7%) anche una PCR>80mg/l; 8 (88,9%) avevano un quadro di addensamento all'Rx del torace e solo 1 di interstiziopatia. I 5 casi con Anf+ e Ag-S.p.-: 3 (60%) avevano leucocitosi e una PCR>80 mg/l; 2 (40%) non avevano leucocitosi e di questi 1 con PCR>80 mg/l; 3 (60%) avevano un quadro di addensamento all'Rx del torace e 2 (40%) di interstiziopatia.

Conclusioni. La ricerca dell'Ag urinario di *S.pneumoniae* sembra contribuire, in modo significativo, alla conferma di un'infezione profonda ad eziologia pneumococcica rispetto all'esame culturale dell'Anf. Infatti tutti i pazienti con Ag-S.p.+ e Anf- presentavano leucocitosi, il 66,7% una PCR>80mg/l e l'88,9% un quadro radiologico di addensamento. Dai nostri dati l'esame culturale dell'Anf, da solo, non è sufficiente per diagnosticare una polmonite da *S.pneumoniae* poiché si associa più spesso a un quadro ematochimico e radiologico variabile.

048

POLMONITE ACQUISITA IN COMUNITÀ IN ETÀ PEDIATRICA: QUALE IL MIGLIOR APPROCCIO DIAGNOSTICO?

Zambolin M.¹, Cavallaro A.², Scarin M.², Andreola B.¹,
Da Dalt L.¹

¹Dipartimento di Pediatria Università di Padova

²Istituto di Microbiologia-Virologia Ospedale-Università di Padova

Introduzione. La polmonite acquisita in comunità in età pediatrica è, tra tutte le comuni patologie infettive a carico delle vie respiratorie, quella in cui la diagnosi eziologica è più complessa da determinare, a causa dell'inadeguatezza dei metodi diagnostici disponibili, sia clinici, che radiologici o microbiologici^{1,2}. Il nostro studio è stato diretto a valutare l'efficacia delle indagini microbiologiche ai fini dell'individuazione dell'agente eziologico.

Materiali e metodi. Studio di tipo prospettico osservazionale su 74 bambini (età tra 1 mese e 15 anni) afferiti presso il Pronto Soccorso pediatrico di Padova ai quali era stata diagnosticata, sulla base dei dati clinico-anamnestici, una polmonite confermata radiologicamente. I pazienti sono stati sottoposti alle seguenti indagini microbiologiche: emocoltura (sistema BACTEC 9240); aspirato nasofaringeo per la ricerca colturale di batteri, di *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* con tecnica PCR in real-time, di influenzavirus A e B, parainfluenzavirus 1-2-3, adenovirus e VRS con immunofluorescenza diretta; indagini sierologiche per *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, influenzavirus A e B, parainfluenzavirus 1-2-3, adenovirus e VRS; ricerca di IgM anti *M. pneumoniae*.

Risultati. L'emocoltura, eseguita in 60 pazienti (81%) è risultata negativa in tutti. L'aspirato nasofaringeo, eseguito in 70 soggetti (94,6%), ha dato i seguenti risultati: positivo per batteri in 35 casi (50%) di cui 15,7% *S. pneumoniae*, 20% *H. influenzae*, 1,4% *M. catarrhalis*, 1,4% *S. ? emolitico di gruppo A*, 1,4% *M. pneumoniae*, 8,6% *S. pneumoniae*+*H. influenzae*, 1,4% *S. pneumoniae*+*M. pneumoniae*; la ricerca di *M. pneumoniae* con PCR in real-time è risultata positiva in 2 casi (2,9%); l'indagine per *C. pneumoniae* è risultata negativa in tutti i campioni così pure la ricerca di virus. Le indagini sierologiche sono state eseguite in 71 pazienti (96%): 8 casi (11,2%) sono risultati positivi per *M. pneumoniae* di cui 7 con IgM positive, 1 caso (1,4%) positivo per influenzavirus A e 1 (1,4%) positivo per influenzavirus B. La sierologia per *C. pneumoniae*, parainfluenzavirus 1,2,3, adenovirus e VRS è sempre risultata negativa.

Conclusioni. Esami tradizionali quali l'emocoltura e la sierologia sono risultati assolutamente non informativi mentre si è dimostrato utile il test per le IgM anti *M. pneumoniae*, sia per l'alta sensibilità e specificità, che per la risposta in tempi rapidi. Relativamente alle ricerche nell'aspirato nasofaringeo, la PCR in real-time risulta di primaria importanza per la migliore sensibilità e accuratezza nei confronti dell'immunofluorescenza, anche nel caso di prelievi con quantità molto scarsa di materiale.

049

COMPARAZIONE DI UN NUOVO TEST CON ANTICORPI MONOCLONALI PER RICERCA DI *H. PYLORI* NELLE FECI VS ALTRI TEST ANALOGHI

Zanetti M.V.¹, Mucignat G.²

¹Laboratorio di Microbiologia

Ospedale Generale "F. Tappeiner" 33012 Merano

²Servizio di Microbiologia e Virologia

- Az. Ospedaliera 33170 Pordenone

Introduzione. Dopo l'introduzione delle tecniche immunoenzimatiche con anticorpi policlonali contro l'antigene di *Helicobacter pylori* (HP) in feci umane, sono state proposte metodiche di seconda generazione basate su miscele di anticorpi anti-HP monoclonali.

Obiettivo di questo lavoro è di valutare l'accuratezza dei test immunoenzimatici di seconda generazione monoclonali (HpSA PLUS Meridian e Dako) Vs policlonale (HpSA Meridian) su feci, per la valutazione dell'infezione da HP e in particolare per valutare l'effettivo ridimensionamento o eliminazione della "zona grigia", fonte spesso di "reazioni dubbie" nei test di prima generazione.

Metodi. Sono stati esaminati un totale di 248 pazienti (131 F, 117 M, età 21 - 74 anni) con test dell'ureasi positivo su biopsie prelevate in corso di gastroscopia. I campioni di feci sono stati raccolti lo stesso giorno dell'esecuzione dell'esame endoscopico, congelati (-20°C) e saggiati nella stessa giornata con i tre differenti test sopra descritti. Si sono comparati i risultati delle tre metodiche con i gli usuali test di riferimento (coltura, test rapido dell'ureasi, UBT ed istologia). Abbiamo ritenuto *campioni HP positivi* quelli che avevano anche il solo esame colturale positivo o almeno due degli altri tests di riferimento positivi ("independent gold standard").

Risultati. I test Meridian HpSA policlonale e monoclonale ed il test Dako hanno dimostrato rispettivamente valori di Sensibilità, Specificità, PPV, NPV, Concordanza di 92,4%, 94,08%, 86,9%, 96,68%, 93,85%, di 97,33%, 95,89%, 90,1%, 98,87%, 96,1%, di 96,05%, 94,59% 87,9%, 98,31%, 95,01%.

Conclusioni.

- 1) Tutti e tre i test valutati sono risultati semplici e veloci da eseguire ed i risultati sufficientemente chiari da interpretare;
- 2) i test immunoenzimatici che utilizzavano anticorpi monoclonali anti-HP hanno dimostrato notevole concordanza con i test di riferimento e tra di loro (>95%), inoltre hanno evidenziato una notevole limitazione della "zona grigia" con riduzione dei dubbi interpretativi per valori di D.O. intorno al rispettivo "cut off".
- 3) i test basati sull'impiego di anticorpi monoclonali si sono rivelati decisamente più "performanti" (specificità, sensibilità, PPV, NPV e concordanza con il "gold standard" maggiori) rispetto al test che impiegava anticorpi policlonali.

050

IMPIEGO DI RAPID YEAST PLUS SYSTEM NELL'IDENTIFICAZIONE RAPIDA DI LIEVITI

Fanello M. R., Molinari G. L., Kroumova V., Crespi I.,
Grasso S., Caroppo M. S., Andreoni S.

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

Introduzione. Il progressivo aumento delle infezioni fungine, in particolare a livello nosocomiale e in pazienti immunodepressi, segnalato in questi ultimi decenni da una serie innumerevole di osservazioni, rende necessario, dove possibile, definire percorsi diagnostici che consentano di individuare più precocemente stipti fungini potenzialmente coinvolti in eventi infettivi. A livello di lieviti, se è noto che *C. albicans* è la specie di più frequente riscontro in campioni clinici, altre specie di *Candida* così come altri lieviti vengono segnalati come responsabili di infezioni nell'uomo, con spettri simili di patologie, anche se con differenze significative nell'evoluzione cliniche e nelle opzioni terapeutiche.

La recente introduzione di nuove molecole antifungine, così come il possibile riscontro di resistenze primitive o secondarie a differenti chemioterapici, rende a maggior ragione indispensabile una corretta e tempestiva identificazione delle specie coinvolte, per una più appropriata scelta del regime terapeutico.

Metodi. Scopo dell'indagine è quello di verificare la sensibilità del sistema rapido (4 ore) di identificazione di Lieviti RapID Yeast Plus System (Remel – Oxoid S.p.A.) su stipti ATCC e di collezione precedentemente identificati con sistema ID32C (BioMerieux).

Risultati. L'indagine eseguita su 40 campioni (4 ATCC e 26 stipti di collezione) ha messo in evidenza una sensibilità complessiva del sistema del 90% e superiore al 95% per le specie di *Candida* con maggior frequenza di isolamento.

Conclusioni. Considerando che *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* rappresentano il 96-98% degli isolati clinici, il sistema RapID ID Yeast Plus può considerarsi, a nostro avviso un'alternativa valida tra i sistemi di identificazione di lieviti, in particolare per il genere *Candida*, tenuto conto che la riduzione dei tempi di identificazione (4 ore) rispetto ad altri sistemi manuali (24-48 ore) non comporta riduzioni significative dei livelli di sensibilità.

051

MICOSI CUTANEE DA DERMATOFITI NEGLI ANNI 2004-2005

Asticcioli S.^a, Di Silverio A.^a, Sacco L.c., Fugazza G.^a,
Pagani L.^a

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

^bClinica Dermatologica I.R.C.C.S. "S. Matteo",
Viale Golgi 19, 27100 Pavia

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

Introduzione. Negli ultimi anni l'incidenza delle dermatofitosi è apparsa in costante aumento tra le popolazioni umane;

più precisamente si è assistito ad un cambiamento nello spettro delle micosi causate dai dermatofiti sia a livello di diffusione di dermatomicosi ed onicomicosi sia a livello degli agenti eziologici. Riveste, perciò, un ruolo importante lo studio epidemiologico degli agenti eziologici diffusi nelle diverse aree geografiche, al fine di stimare la frequenza delle specie fungine patogene e la loro preferenziale sede di infezione. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare la prevalenza delle specie di dermatofiti isolati dalla cute e dagli annessi cutanei di pazienti afferenti alla Clinica Dermatologica dell'I.R.C.C.S. S. Matteo di Pavia negli anni 2004-2005.

Metodi. Alla raccolta dei ceppi ha fatto seguito l'esame colturale eseguito attraverso l'utilizzo di diversi terreni; l'incubazione è avvenuta ad una temperatura di 28-30 °C per un periodo di tre-quattro settimane nelle quali è stata accertata la crescita del fungo e l'eventuale presenza di funghi non-dermatofiti.

L'identificazione a livello di genere e di specie è avvenuta tramite l'osservazione macroscopica e microscopica del ceppo fungino permettendo il riconoscimento di 52 dermatofiti e 4 funghi non-dermatofiti, responsabili di dermatomicosi in diverse sedi anatomiche.

Risultati. I ceppi appartenenti al genere *Trichophyton* sono stati: *T. rubrum* (44,2%), *T. mentagrophytes* (13,5%) e *T. violaceum* (3,8%). Due sono state, invece, le specie isolate appartenenti al genere *Microsporum* e precisamente *M. canis* (26,9%) e *M. gypseum* (9,6%). Il genere *Epidermophyton* è stato isolato come *E. floccosum* nel 2% dei casi.

Conclusioni. L'analisi dei dati raccolti ha permesso di evidenziare come a livello di genere *Trichophyton* risulta essere il più frequentemente isolato mentre a livello di specie patogene risalta l'alta percentuale (71,1%) dei soli ceppi di *T. rubrum* e *M. canis*. Dallo studio appare, inoltre, evidente la predilezione di alcune specie dermatofite per precise aree del corpo.

052

EPIDEMIOLOGIA DELLE MENINGITI BATTERICHE NELL'AREA SPEZZINA: ESPERIENZA DELL'ANNO 2005

Battolla E., Via F., Orlandi R., Orlandini F., Guarino R.,
Senesi G., Vallarino M., Dono M.

U.O. Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche
Osp. S. Andrea, La Spezia.

Introduzione. In Italia i casi di meningite batterica notificati ogni anno sono in media 871 (dati dell'ISS). Nell'anno 2005 le meningiti sono state circa 945. L'Italia ha un'incidenza media di 0,4 casi/100.000 abitanti che è circa 3 volte inferiore alla media europea (1,4 casi/ 100.000 abitanti). Noi riportiamo l'esperienza dell'ASL5 Spezzino nella sorveglianza epidemiologica delle meningiti batteriche per l'anno 2005.

Metodi. Sono stati raccolti i dati riguardanti i pazienti arrivati alla nostra osservazione con sospetta diagnosi di meningite.

Risultati. La provincia di La Spezia con i suoi 32 comuni conta circa 220.000 abitanti. Il numero di pazienti giunti all'Osp. S. Andrea con diagnosi confermata di meningite nell'anno 2005 sono stati 8. In solo un caso la diagnosi è stata effettuata unicamente con la colorazione GRAM (diplococchi GRAM negativi), cui non è seguita nessuna crescita del germe. Dei rimanenti 7 casi, 3 sono risultati essere *N. meningitidis*.

gittidis (2/3 ceppo C:2b, 1/3 ceppo 2a); 3 *S. pneumoniae* e 1 *E. faecalis*. Per quest'ultimo, l'agente eziologico della meningite correlava con condizioni igieniche estremamente precarie del pz. L'età media dei pazienti era di 44 anni (range 17-76aa). Tutti i pazienti sono sopravvissuti, ad eccezione di un unico caso fulminante di meningite da *S. pneumoniae*.

Conclusioni. L'eziologia delle meningiti batteriche nell'area spezzina per l'anno 2005 indica la prevalenza di *N. meningitidis* e *S. pneumoniae*, con un solo caso eccezionale di meningite da *E. faecalis*. In conclusione i nostri dati non si discostano da quelli nazionali riportati dall'ISS, per i quali i due patogeni sopracitati sono responsabili del 61% di tutte le meningiti in Italia (anno 2005). Tuttavia, i dati sembrerebbero indicare un'incidenza media di circa 3,5 casi/100.000 abitanti nella provincia di La Spezia, che rifletterebbe l'andamento stesso della Liguria (circa 2,5 casi/100.000 abitanti) anche se lievemente più alto.

053

CHERATITE SEVERA DA *FUSARIUM PROLIFERATUM* IN PORTATORE DI LENTI A CONTATTO GIORNALIERE

Casella P.¹, Di Giacomo N.², Farina C.³, Lombardi G.⁴

¹SMEL, A.O. "Ospedale di Vercate" Presidio di Vercate, Via C. Battisti 23, 20059 Vercate.

²Divisione di Oculistica, A.O. "Ospedale di Vercate" Presidio di Vercate, Via C. Battisti 23, 20059 Vercate.

³U.O. Microbiologia A.O. "Ospedale S. Carlo Borromeo", via Pio II 3, 20153 Milano.

⁴Laboratorio di Microbiologia A.O. "Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi" viale Borri 57, 21100 Varese.

Introduzione. Raramente tra i fattori di rischio delle cheratiti microbiche è descritto l'uso di lenti a contatto. I funghi ne sono causa soprattutto nei paesi a clima caldo, di queste il 25-62% è sostenuto da *Fusarium* spp. Descriviamo un caso di cheratite severa da *Fusarium proliferatum* in portatrice di lenti a contatto giornaliere.

Metodi. Lo scraping corneale venne seminato in Agar sangue, Agar cioccolato (incubazione CO₂ 10%) e agar Sabouraud. (aerobiosi) fino a 5 giorni secondo BSOP 2. L'identificazione definitiva su basi morfologiche e colturali venne condotta presso l'Ospedale San Carlo Borromeo di Milano.

Risultati. M.S. femmina, normoergica, aa 28, portatrice cronica di lenti a contatto, il giorno 24/12/2005 si presentava in pronto soccorso con piccolo infiltrato corneale. Venne sottoposta a terapia locale con netilmicina. Il giorno 30/12 si ripresentò con voluminoso ascesso corneale e ipopion. Venne eseguito scraping ed inviato nel laboratorio del P.O. di Vercate per esame colturale. Dopo 3 giorni vennero isolati miceti filamentosi ialini, identificati in quinta giornata come *Fusarium* spp.

Sulla scorta del referto microbiologico si iniziò terapia con anfotericina B e.v. La paziente non migliorava e veniva sottoposta a due interventi di trapianto corneale, il giorno 17 gennaio e 10 febbraio, senza successo.

Dopo il primo intervento veniva iniziata senza successo terapia con voriconazolo ev. Il giorno 12 febbraio la paziente fu ricoverata all'Istituto Barraquerr di Barcellona per trattamento con anfotericina B in perfusione continua per 30 gior-

ni, con remissione completa dell'infezione e recupero del visus (7/10).

Conclusioni. L'infezione descritta non è correlata ai casi di cheratite da *Fusarium* riportati su MMWR in Aprile 2006 e accaduti in USA nel secondo semestre 2005. La collaborazione in tempi stretti tra microbiologi e clinici è stata determinante nell'individuazione, nel trattamento e nella risoluzione del caso.

054

TINEA INCOGNITO DA MICROSPORUM GYPSEUM. DESCRIZIONE DI UN CASO IN UN SOGGETTO HIV+

Fazii P.¹, Parruti G.², Russi C.¹, Consorte A.², Polilli E.¹, Pelatti A.¹, D'Amico G.², Crescenzi C.¹, Gattone M.C.¹, Riario Sforza G.¹

¹U.O. di Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia

²U.O. Malattie Infettive, P.O. "Spirito Santo",

Via Fonte Romana, 8, 65124 Pescara

Introduzione. La tinea incognito è una particolare forma di dermatofitosi modificata nell'aspetto dall'uso incongruo di corticosteroidi applicati localmente per errata diagnosi oppure somministrati per via sistemica per la terapia di altre patologie. Gli agenti causali di questa micosi sono abitualmente i dermatofiti antropofili (soprattutto *Trichophyton rubrum*), molto più raramente quelli zoofili e geofili. I soggetti HIV+, anche durante le fasi di progressione della virosi, non sembrano presentare una prevalenza più elevata di dermatofitosi rispetto agli immunocompetenti; è vero invece che, nei soggetti immunodepressi, queste micosi superficiali si possono presentare più estesamente e con maggior coinvolgimento del derma e degli annessi cutanei e spesso sono più resistenti alle terapie.

Caso clinico. Descriviamo un caso di tinea incognito in un soggetto HCV+ e HIV+ pervenuto alla nostra osservazione nel 2006. Si è trattato di un soggetto di sesso maschile di 37 anni di Pescara, meccanico, ex tossicodipendente, HIV+ dal 1994, affetto da AIDS conclamato dal 1997. Negli ultimi anni la situazione clinica era nettamente peggiorata, con fallimento terapeutico e con i CD4 che si presentavano costantemente < 100 /mL. Dalla seconda metà del 2005 il paziente presentava delle lesioni psoriasiformi sul viso, sulle mani e delle unghie e, per tale motivo, era stato trattato anche con corticosteroidi topici, che avevano peggiorato il quadro sintomatologico. L'esame micologico diretto dimostrò numerose ife ialine settate, mentre all'esame colturale, dopo circa dieci giorni, si evidenziarono delle colonie fungine; l'osservazione macro- e micro-morfologica delle stesse condusse all'identificazione della specie *Microsporum gypseum*. Solo la terapia con amphotericina B liposomiale è riuscita a controllare il problema dermatologico, con netto miglioramento del quadro sintomatologico. Il caso è stato segnalato per la rarità delle dermatofitosi da *Microsporum gypseum* nei soggetti HIV+ e per la particolare presentazione della dermatofitosi.

055

SCREENING BATTERIOLOGICO PER SGB IN DONNE GRAVIDE A TERMINE REALTÀ LOCALE

Ferrari L.

Laboratorio di Microbiologia
Azienda Ospedale di Cremona

Introduzione. La presenza di *Streptococcus agalactiae* (SGB) sulla mucosa vaginale e rettale delle donne al termine della gravidanza, rappresenta un grave fattore di rischio infettivo per il nascituro.

Lo scopo della ricerca è stato verificare la presenza di SGB nei distretti vaginale e rettale delle pazienti gravide afferenti alla Divisione di Ostetricia dell'Ospedale di Cremona, al fine di determinarne la frequenza di colonizzazione. Alle donne risultate colonizzate da SGB in uno o in entrambe i distretti, (come da protocollo) è stato somministrato, durante il travaglio, un trattamento antibiotico profilattico a base di ampicillina per via parenterale. L'efficienza della profilassi è stata poi verificata valutando la frequenza con la quale gravide colonizzate da SGB hanno partorito neonati colonizzati a loro volta.

Materiali e Metodi. E' stata condotta un'indagine retrospettiva sui dati microbiologici, (relativi alla presenza di SGB), provenienti da 5056 donne transitate per Divisione di Ostetricia dell'Azienda Istituti Ospitalieri, di Cremona nel periodo: gennaio 2001 - dicembre 2005 e sui neonati. I dati sono riferiti alle indagini culturali eseguite su: Tampone Vaginale (TV) e Rettale (TR) prelevati alle gestanti in 35-36ma settimana di gravidanza e T.Auricolare (TA), T.Faringeo (TF) e T. Rettale (TR) prelevati ai nati partoriti da donne con almeno un tampone risultato positivo per SGB.

I tamponi sono stati seminati su agar sangue Columbia+CNA (BD) e l'identificazione è stata eseguita mediante test in agglutinazione su vetrino (Oxoid)

Risultati e Conclusioni. L'analisi dei dati evidenzia 3697 gestanti (73.1 %) risultate negative per entrambe i tamponi, mentre 548 (10.8%) presentano entrambe i campioni positivi. In 608 donne (12.0 %) si evidenzia positività del TR mentre risulta completamente negativo il TV. Solo 203 donne (4.0%) presentano positività del TV non confermata dal TR, che risulta completamente negativo.

Globalmente in 1359 gestanti (26.9 %) è stato isolato SGB da almeno uno dei due tamponi effettuati, ciò si traduce in un elevato rischio di trasmissione di SGB al nascituro. La frequente positività del TR abbinata ad una negatività del TV (608 casi, pari al 12.0%) sottolinea la necessità di effettuare sempre la ricerca di SGB su entrambe i distretti, onde evitare risultati falsamente negativi, non evidenziabili dall'esecuzione del solo TV.

Da 106 nati da madri positive (7.8%), nonostante profilassi, è stato isolato SGB da almeno uno dei tre campioni biologici valutati (TA, TR, TF).

056

CANDIDOSI ORALE: ASPETTI CLINICI E MICROBIOLOGICI

Gatti M., Rizzati T.G., Almeria M.

Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche,
Sez. di Microbiologia, Alma Mater Studiorum,
Università degli Studi di Bologna Via S.Vitale 59, 40125 Bologna.

Introduzione. I miceti del genere *Candida* sono comuni del cavo orale. Nell'ultimo decennio le infezioni del cavo orale sono aumentate come incidenza, sia per l'aumentata richiesta di diagnosi di infezioni orali da parte dei clinici sia per la pandemia sostenuta dall'AIDS. Scopo del presente lavoro è stato rivolto alla ricerca di *Candida* spp. in soggetti presunti sani per rilevarne l'incidenza, individuare le specie più frequenti per attuare un corretto protocollo di igiene orale intento a prevenire le manifestazioni cliniche.

Metodi. Sono stati analizzati 47 prelievi microbiologici ottenuti attraverso l'utilizzo di tamponi della mucosa orale o del palato di 47 partecipanti, suddivisi in due gruppi: gruppo I comprendente 14 pazienti con età maggiore di 65 anni; gruppo II comprendente 33 pazienti con età inferiore ai 65 anni. Previa osservazione microscopica diretta i campioni sono stati seminati su piastre di Sabouraud Dextrose agar addizionato di cloramfenicolo (Biolife) e/o Chromoagar (Alfa-Wasserman) e incubati a 37°C in aerobiosi per un massimo di quattro giorni. Le colonie cresciute su entrambi i terreni venivano identificate mediante test di filamentazione e prove biochimiche di assimilazione di carboidrati API 20C AUX (bioMérieux). Per *Candida dubliniensis* è stata verificata anche la negatività della crescita delle colonie sia a 42°C sia a 45°C ed in brodo con il 6.5% di NaCl.

Risultati. Hanno evidenziato che il 38% del campione totale era positivo nei confronti dei miceti del genere *Candida* e il 62% era negativo. Nel gruppo I i pazienti positivi erano il 43% e sono state identificate le specie:

C. albicans e *C. glabrata*. Nel gruppo II i pazienti positivi erano il 33% e sono state identificate le specie: *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*.

Conclusioni. Nonostante le numerose specie di *Candida* che sono state isolate, la specie predominante è risultata essere *C. albicans*, identificata anche in campioni che proponevano fattori di rischio confermati dalla letteratura, quali presenza di una protesi totale removibile e diabete mellito. I pazienti positivi sono stati sottoposti ad un preciso protocollo di igiene orale che prevedeva: incontri motivazionali atti all'informazione circa i rischi e le possibili complicazioni dovute alla presenza del microrganismo identificato; istruzioni circa l'igiene orale domiciliare e l'igiene e la cura di eventuali protesi removibili; detartrasi; rivalutazione della compliance a 3 e 6 mesi.

057

INFLUENZA DELL'EQUILIBRIO REDOX SULLE INFEZIONI DA *CANDIDA ALBICANS*

Grosso S.¹; Lucini V.¹; Pannacci M.¹; Malandrin S.²; Scaglione F.¹

¹Università degli studi di Milano, Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Via Vanvitelli 32, 20129 Milano.

²Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Fatebenefratelli e Oftalmico, 20121 Milano.

Introduzione. Lo stato ossidoriduttivo dei macrofagi, sembrerebbe implicato nella regolazione del killing intracellulare di *Candida albicans* e dell'attivazione di geni pro-infiammatori.

Nel corso di un'infezione, gli antiossidanti, capaci in condizioni fisiologiche di contrastare efficacemente l'azione dei ROS, potrebbero però essere insufficienti.

Nel nostro lavoro, abbiamo esaminato, durante un'infezione da *C. albicans*, il ruolo svolto dal Glutathione (GSH) e l'eventuale correlazione tra l'antiossidante e la produzione di ossido nitrico (NO).

Metodi. Macrofagi murini J774A.1 infettati con *C. albicans*, vengono mantenuti per 60 min a 37°C in terreno contenente 5 mM di N-Acetil Cisteina (NAC, precursore del GSH), o 500 mM di Butionina-sulfossimina (BSO inibitore della sintesi di Glutathione), o 0.1 mM di H₂O₂. Le *Candida* vitali sono valutate, dopo incubazione per 48 ore a 37°C, mediante diluizione seriale su piastre di Sabouraud agar mentre la concentrazione di GSH è determinata spettrofotometricamente. Infine, l'espressione di iNOS (NO-sintasi inducibile), responsabile della produzione di NO, è studiata mediante Real Time PCR nei macrofagi infetti.

Risultati. J774A.1 trattate con H₂O₂ o BSO hanno evidenziato un aumento del numero di *Candida* vitali e una diminuzione della concentrazione di GSH (P<0.001). NAC ha determinato, invece, un'inibizione della crescita fungina e un aumento della concentrazione di GSH (P<0.001).

L'associazione NAC con H₂O₂ e BSO ha mostrato un aumentato killing e una maggior concentrazione di GSH. Il trattamento con H₂O₂ e con BSO ha evidenziato un'aumentata espressione di iNOS mentre NAC ne ha indotto una minore sintesi rispetto alle cellule non trattate (P<0.001). L'associazione ha portato a una diminuita espressione di iNOS.

Conclusioni. I risultati ottenuti indicano che il GSH potrebbe svolgere un ruolo importante nel killing intracellulare di *C. albicans* e nella regolazione dei livelli di iNOS in macrofagi murini.

La modulazione di GSH potrebbe, pertanto, avere importanti implicazioni cliniche nel controllo di infezioni fungine opportunistiche.

058

RESISTENZA AGLI ANTIFUNGINI IN STIPITI DI *CANDIDA* SPP. ISOLATI DA PAZIENTI ADULTI E PEDIATRICI

Marchese A.¹, Gualco L.¹, Bandettini R.², Peri C.², Cavallero A.³, Ossi M.C.³, Schito G.C.¹

¹ Di.S.C.A.T. – Sezione di Microbiologia, Università di Genova

² Laboratorio di Microbiologia Clinica, Istituto Giannina Gaslini, Genova

³ Laboratorio di Microbiologia Clinica, Ospedale San Raffaele, Milano

Introduzione. L'incidenza di infezioni causate da miceti è aumentata drammaticamente nelle ultime due decadi, in particolare tra i pazienti immunocompromessi. Scopo di questo studio è stato determinare le percentuali di resistenza agli antifungini in stipiti di *Candida* spp. isolati recentemente da campioni clinici provenienti da pazienti adulti e pediatrici.

Metodi. Sono stati studiati 618 stipiti di *Candida* spp. (410 *C. albicans*, 108 *C. glabrata*, 46 *C. parapsilosis*, 43 *C. tropicalis* e 11 *C. krusei*) isolati nel periodo 2002-2005. La sensibilità a fluconazolo, itraconazolo, flucitosina e amfotericina B è stata determinata mediante la metodica della diluizione in brodo, mentre per voriconazolo è stato utilizzato il saggio di diffusione da disco (CLSI/NCCLS).

Risultati. Nessuna differenza significativa è stata osservata nelle percentuali di stipiti resistenti in dipendenza dell'età del paziente, con l'eccezione di *C. albicans* e itraconazolo (p≤0.001). Amfotericina B si è dimostrato il più potente antimicotico nei confronti di tutte le specie studiate. Solo lo 0.7% di *C. albicans* ed il 3.7% di *C. glabrata* è risultato refrattario al fluconazolo. Le più elevate percentuali di resistenza in *C. albicans* a fluconazolo, itraconazolo e flucitosina sono state osservate tra gli stipiti isolati da urine e tessuti molli (1.7, 1.7, 0.9 e 7.1, 5.0, 10.0 rispettivamente). Tutti i microrganismi, inclusi quelli resistenti a fluconazolo ed itraconazolo, sono risultati sensibili a voriconazolo.

Conclusioni. Non sono state osservate differenze significative per la sensibilità agli antifungini negli stipiti isolati sia da soggetti adulti che pediatrici. Globalmente l'attività degli antimicotici saggiati nelle diverse specie di *Candida* risulta ancora soddisfacente.

059

SENSIBILITÀ AGLI ANTIFUNGINI DI CEPPI DI *C. ALBICANS* ISOLATI DA VULVOVAGINITI RECIDIVANTI (RVVC).

Paccagnella S.*, Bertoloni G., Rassa M.°, Scarin M.*

*Microbiologia e Virologia Azienda Ospedaliera di Padova, Via Giustiniani 2, 35127 Padova;

°Microbiologia Ospedale S. Bortolo di Vicenza,

Via Rodolfo 37, 36100 Vicenza;

Dipartimento di Istologia e Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Via A. Gabelli 63, 35121 Padova.

Introduzione. *C. albicans* può essere responsabile di vulvovaginiti in circa tre donne su quattro, in età fertile, in particolare nel corso di gravidanza o nel diabete. Nel 5% dei casi, nonostante il trattamento con antifungini, si verificano alme-

no 4 episodi nell'arco di un anno che vengono definiti come vulvovaginiti recidivanti (RVVC).

Gli antifungini impiegati, quali azolici e polienici, esplicano la loro azione inibendo la sintesi o interagendo direttamente con l'ergosterolo, principale componente della membrana cellulare dei funghi.

In questo studio è stata determinata l'attività di: Amfotericina B, Fluconazolo, Itraconazolo, Ketoconazolo, 5-Fluorocitosina e Voriconazolo, in 138 ceppi di *C. albicans* isolati nell'arco di un anno da pazienti in età fertile con RVVC.

Materiali e metodi. Per la determinazione della MIC è stato utilizzato un metodo microdiluizione in piastra (Sensititre Yeastone) e come ceppi di riferimento *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. La lettura dei risultati dopo incubazione a 35° per 24 h e 48h. I risultati sono stati interpretati sulla base delle linee guida NCCLS (A27M3 2003).

Risultati. Un solo ceppo è risultato resistente all'Itraconazolo, il 5.07% sensibile-dose-dipendente nei confronti di almeno un farmaco. Il 21,7% è sensibile-dose-dipendente nei confronti di Fluconazolo e 5-Fluorocitosina e il 4.34% nei confronti dell'Itraconazolo. La MIC₅₀ e la MIC₉₀ hanno confermato l'ampia sensibilità dei ceppi di isolamento genitale.

Conclusioni. Possiamo quindi concludere che: i) i valori di MIC ottenuti non si discostano dai dati di letteratura; ii) la vulvovaginite recidivante non è associata ad aumento della resistenza agli antifungini, nonostante il 30% delle pazienti, all'anamnesi, dichiarava di aver effettuato una terapia con azoli. Le recidive sembrano essere imputabili ad altri fattori, fra cui condizioni legati al paziente: dismicrobismo, variazioni di pH, ormonali, immunitarie o ad una corretta terapia.

060

BAMBINO CON TINEA CAPITIS DA TRICHO-PHYTON SOUDANENSE: CASE REPORT

Passera M.¹, Arosio M.¹, Di Landro A.², Grossi A.³, Bergamaschi S.³, Bargiggia G.¹, Raglio A.¹, Vailati F.¹, Grigis A.¹, Passerini Tosi C.¹.

¹USC Microbiologia e Virologia,

²USC Dermatologia,

A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo, Largo Barozzi 1, 24128 Bergamo

³Laboratorio Analisi, A.O. Treviglio e Caravaggio.

Introduzione. Il *Trichophyton soudanense* è un dermatofita antropofilo comune in Africa ma di raro isolamento nei paesi occidentali, correlato ai fenomeni migratori. Il contagio di solito interumano interessa soprattutto i bambini, determinando abitualmente Tinea capitis piuttosto che Tinea corporis.

Case Report. Descriviamo un caso autoctono di un bambino nigeriano di 7 aa., nato e vissuto in Italia con familiari che negavano viaggi recenti nel loro paese d'origine. Giungeva alla nostra osservazione per la comparsa di chiazze di alopecia multiple del capillizio, ad estensione rapida, insorte da 20 giorni, asintomatiche, di varie dimensioni, alcune isolate ma la maggior parte confluenti, con capello tronco ad alcuni mm dall'ostio. Non erano presenti segni di flogosi. L'esame microscopico a fresco evidenziava la pre-

senza di ife multiple lungo il fusto del pelo e spore raggruppate, che facevano porre diagnosi di tinea capitis. L'esame colturale era positivo per *Trichophyton soudanense*. La terapia con Griseofulvina per os e Amorolfina come topico ha portato alla regressione completa del quadro dopo 75gg. L'esame clinico della famiglia non ha evidenziato manifestazioni sospette nei genitori, né nella sorellina di 7 mesi mentre nella sorella di 18 anni si sono osservate delle aree squamose della regione frontale, non alopeciche, dalle quali si è eseguito un prelievo per esame colturale, che è in corso.

Metodi. Colonie piatte, a lenta crescita (10-15 gg), sfrangiate, color albicocca, finemente vellutate tendenti al cotonoso ed al giallo, verso della colonia dal giallo al rosso bruno; *reflexive hyphae*, frammentazione in artroconidi delle ife, macroconidi assenti, microconidi a goccia identificano per *T. soudanense*.

L'identificazione veniva confermata al sequenziamento della regione D2 della subunità LSU ribosomiale (MicroSeq D2, Applied Biosystems).

Conclusioni. Negli ultimi anni si osserva un incremento delle segnalazioni di isolamento in Italia di *T. soudanense*, ceppo "tipicamente" africano, da importazione. Il nostro caso non sembrerebbe correlato al fenomeno migratorio anche se la Letteratura riporta l'esistenza di portatori asintomatici di *T. soudanense* al capillizio.

060A

COMPARAZIONE DELLA SENSIBILITÀ DI CANDIDA ALBICANS NEI SAGGI MIC E IN GEL DI COLLAGENE

Cagnacci S.¹, Anatali L.¹, Palenzona A.¹, Marchese A.¹, Debbia E.A.¹, Corvò R.², Rossi L.¹.

¹DISCAT sez. Microbiologia, Università di Genova.

²Centro di Radioterapia, Università di Genova.

Introduzione - La grande rilevanza clinica delle micosi ha stimolato lo sviluppo di nuovi tests per valutare l'efficacia agli antimicotici. A questo scopo stiamo lavorando alla definizione di un modello di crescita di *C. albicans* in gel di collagene. Questo supporto tridimensionale favorisce le diverse transizioni morfologiche degli organismi dimorfici come la Candida. Inoltre, offre l'opportunità di valutare una serie di parametri quantitativi e morfologici importanti per la definizione dei saggi di sensibilità agli antimicotici.

Metodi - Il modello base è la crescita cellulare in gel di collagene tipo I. E' stato utilizzato un ceppo di *Candida albicans* isolato da un paziente immunocompromesso, sensibile all'Amfotericina B (AmB, MIC 0.25 µg/ml) e resistente al Ketoconazolo (Kc, MIC > 2 µg/ml). Le Candide sono state inserite nel collagene e trattate con varie dosi di farmaco. La sopravvivenza è stata valutata con la conta delle CFU.

Risultati

- 1) Nel gel di collagene le Candide sono cresciute come organismi sessili esprimendo le diverse morfologie filamentose tipicamente presenti nei biofilm;
- 2) Migrando sulla superficie plastica le cellule sono diventate planktoniche proliferando come forme yeast;
- 3) Kc ha inibito la crescita delle Candide sessili (p<0.0001 rispetto al controllo), in particolare bloccando l'espressione delle forme filamentose;
- 4) AmB non sembra interferire con le forme sessili in quanto il numero di Candide sopravvissute era simile nel trat-

tato e nel controllo.

Conclusioni

- 1) Questi risultati hanno messo in evidenza una forte discordanza con i tests MIC in quanto concentrazioni sub-inibenti di Kc hanno indotto una inibizione significativa delle *Candida* nel gel di collagene;
- 2) Il contesto sperimentale favorisce quindi il nostro modello rispetto ai saggi MIC, in quanto più vicino alla realtà clinica;
- 3) Pertanto si propone il suo uso ad integrazione dei tests MIC per identificare i farmaci antimicotici. (Ricerca condotta con il supporto della Pfizer Italia).

061

DIAGNOSI OCCASIONALE DI INFESTAZIONE ENTERICA DA *DIPHYLLOBOTHRIUM* spp.

Arzese A.^{1,2}, Beltrame A.¹, Scudeller L.¹, Tavio M.¹, Cadeo B.¹, Fabbro E.², Londero A.¹, Viale P.¹.

¹Clinica di Malattie Infettive, Policlinico Universitario a Gestione Diretta, v. Colugna 50, 33100 UDINE

²Cattedra di Microbiologia, Dipartimento di Ricerche Mediche e Morfologiche, Università degli Studi di Udine, p.le Kolbe 3, 33100 UDINE

Introduzione. L'infestazione da *Diphyllbothrium* spp (botriocefalosi), la cui diagnosi è spesso occasionale, si accompagna al consumo di pesce crudo d'acqua dolce. La distribuzione del cestode pare ubiquitaria: a livello europeo un recente studio retrospettivo di prevalenza ha evidenziato un aumento delle segnalazioni, quasi esclusivamente sporadiche, di casi soprattutto in Francia ed Italia, correlati ad aree lacustri.

Caso clinico. Un soggetto di 45 anni, maschio, italiano, veniva ricoverato per febbre persistente da oltre 1 mese.

In anamnesi riferiva viaggio recente in Grecia e Turchia, successivo all'esordio della FUO, assunzione di paracetamolo, azitromicina per alcuni giorni, poi associata a cefotaxime per 8 gg, senza beneficio. L'esame obiettivo rivelava lieve epatomegalia e minime alterazioni dei rumori respiratori; gli esami ematochimici evidenziavano aumento degli indici di flogosi, anemia microcitica, leucocitosi neutrofila ed ipereosinofilia (6.4%). Venivano eseguiti accertamenti radiologici (torace), ecografici (cuore, addome) TAC, colonoscopia, approfondimento indagini chimico-cliniche e microbiologiche per ricerca patogeni ad ampio raggio, senza nessuna evidenza specifica. In base ad anamnesi ed ipereosinofilia, venivano eseguiti ricerca di parassiti ematici, ripetutamente negativa, ed esame parassitologico standard su raccolta seriata di feci, con riscontro di numerose uova opercolate (45 x 70 µm). Tale reperto era suggestivo di infestazione da *Diphyllbothrium* spp, diagnosi occasionale, non compatibile tuttavia con la sintomatologia febbrile riportata, associabile all'anemia ed ipereosinofilia, e correlabile con assunzione di pesce crudo al Lago di Garda avvenuta un mese prima dell'insorgenza della FUO. Veniva pertanto somministrato praziquantel (25 mg/kg ogni 8 h in unica giornata); durante la degenza si assisteva ad una progressiva e spontanea defervescenza della febbre, e nel follow-up la risoluzione dell'infestazione enterica e dei parametri correlati, mentre il quesito di FUO è ancora in corso.

Conclusioni. Si conferma l'occasionalità delle diagnosi di

botriocefalosi, in quanto solitamente pauci-sintomatiche, e la persistenza di habitat endemici nazionali noti da vari decenni. Le nuove tendenze alimentari possono aumentare altresì il rischio di infestazione.

062

DIAGNOSI DI DISTOMATOSI EPATICA: PRESENTAZIONE DI UN CASO CLINICO

Arzese A.^{1,2}, Beltrame A.¹, Cristini F.¹, Rorato G.¹, Fabbro E.², Negri C.¹, Crapis M.¹, Viale P.¹.

¹Clinica di Malattie Infettive, Policlinico Universitario a Gestione Diretta, v. Colugna 50, 33100 UDINE

²Cattedra di Microbiologia, Dipartimento di Ricerche Mediche e Morfologiche, Università degli Studi di Udine, p.le Kolbe 3, 33100 UDINE

Introduzione. Le patologie da importazione sono una realtà in costante aumento ed evoluzione, che consegue sia ai flussi migratori da paesi endemici, con frequenti rientri al paese di origine, sia ai numerosi soggiorni di europei in luoghi esotici. La presentazione clinica di più frequente riscontro al rientro dai Tropici è la febbre, accompagnata o meno da diarrea; a seguire si riscontrano rash cutaneo, e sintomi neurologici.

Caso clinico. Si presenta il caso di un soggetto di 29 anni, maschio, originario della Thailandia, in Italia dal 2005, che a distanza di 15 gg dal rientro dopo due mesi di permanenza al paese di origine presentava febbre elevata (40 °C) con brivido, astenia, e diarrea transitoria precedente all'insorgenza della febbre. L'esame obiettivo al ricovero rivelava iperemia congiuntivale, epatosplenomegalia, e tra i parametri bioumorali si evidenziavano incremento degli indici di flogosi, lieve rialzo di transaminasi, di monociti e di creatinina. In aggiunta al pannello di indagini per FUO, si effettuavano ecografia addominale, con riscontro di minute cisti ed altre formazioni ipoecogene in sede di ilo epatico, ricerca di parassiti ematici come da protocollo standard, con esito ripetutamente negativo, ricerca IgM/IgG anti-Dengue con riscontro suggestivo di infezione remota, ed esame coproparassitologico standard su raccolta seriata, con individuazione di uova opercolate di piccole dimensioni (15 x 33 µm). Tale reperto, in associazione ai dati anamnestici, epidemiologici e clinici permetteva di definire diagnosi di distomatosi epatico-biliare da *Clonorchis/Opisthorchis*. Alla terapia antibiotica iniziale (ceftriaxone) veniva aggiunto praziquantel (25 mg/kg ogni 8 h in unica giornata): il follow-up rivelava completa risoluzione del quadro clinico, rientro nel range di normalità dei parametri bioumorali, e negativizzazione dell'esame coproparassitologico.

Conclusioni. Appare importante in caso di FUO al rientro dai Tropici mantenere un ampio raggio di ipotesi diagnostiche, includendo quindi di default i protocolli standard per parassitosi, e risulta indispensabile l'integrazione di dati anamnestici, epidemiologici, clinici e microbiologici per il raggiungimento della diagnosi conclusiva.

063

STRATEGIE NELLA DIAGNOSI DELLA TOXOPLASMOSI NEL NEONATO: SCREENING SIEROLOGICO E METODOLOGIE

Avagliano G., Piccoli S., Grisolia V., Poziello A.,
Petagna C., Battisti S., Sansone D., Rossano F.

Azienda Università Policlinico,
Università degli Studi di Napoli Federico II°.
Area funzionale di Diagnostica Microbiologica.

Introduzione. La toxoplasmosi è una malattia causata da *Toxoplasma gondii*, un protozoo parassita intracellulare obbligato largamente diffuso in natura, il cui ospite definitivo è il gatto. Le principali manifestazioni cliniche sono: linfadenopatia, coriorretinite e meno frequentemente miocardite. La toxoplasmosi è generalmente inapparente nei soggetti immunocompetenti. Le donne sieropositive prima della gravidanza, non trasmettono il parassita ai loro figli. Quelle che sono sieronegative e contraggono l'infezione durante la gravidanza possono trasmetterla al feto. L'infezione intrauterina da toxoplasma può causare morte fetale, fetopatia manifesta o, tardiva nascita del bambino. Nel caso in cui la fetopatia si manifesti alla nascita, si possono avere sia gravi forme di visceropatia incompatibili con la vita, sia forme caratterizzate da lesioni oculari, sintomi neurologici, idrocefalo, calcificazioni ossee. Le forme inapparenti alla nascita possono comparire a distanza di mesi o di anni causando disturbi oculari o nervosi. In genere nei bambini contagiati alla fine della gravidanza prevalgono le infezioni latenti. È perciò opportuno seguire il neonato nei primi mesi di vita e, se è possibile, oltre, seguendo i movimenti anticorpali, ladove la madre era ritenuta infetta. Tale progetto può essere effettuato mediante screening sierologici, al fine di consentire una pronta e mirata terapia, scongiurando seri danni al bambino. Come è noto le IgM sono le prime ad essere prodotte nel corso di una infezione.

Metodi e risultati. Scopo del nostro studio è stato quello di mettere a confronto i risultati ottenuti con la metodica ISAGA e quelli ottenuti utilizzando la metodica ELFA per la rilevazione degli anticorpi della classe delle IgM nei neonati; si è giunti così a concludere che la metodica ELFA ci è stata utile per segnalare la presenza di piccole quantità di IgM in alcuni neonati I valori che risultavano con metodo ELFA superiori a 0,25 venivano poi testati col metodo ISAGA e tutti confermavano la presenza di IgM.

064

INTERPRETAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-TOXOPLASMA IgM A BASSO TITOLO

Clerici P., De Paschale M., Cagnin D., Cerulli T., Belvisi L.,
Manco M.T., Marinoni L., Agrappi C., Mirri P., Viganò E.F.

U.O. Microbiologia, Ospedale Civile di Legnano
Via Candiani 2, 20025 Legnano (Mi)

Introduzione. La ricerca di anticorpi anti-*Toxoplasma* IgM è determinante nella diagnosi d'infezione, ma non sempre è facile una corretta interpretazione poichè, in alcuni casi, le

IgM possono scomparire velocemente o persistere a lungo. Abbiamo valutato la presenza di IgM anti-*Toxoplasma* in soggetti afferenti all'Ospedale di Legnano per un controllo nel periodo 2004-2005.

Metodi. Gli anticorpi IgM sono stati ricercati con metodica ELISA (ETI-TOXOK-M reverse PLUS, DiaSorin) in 4786 soggetti. I campioni positivi sono stati saggiati con metodica ELFA (VIDAS-Toxo-IgM, BioMérieux) ed è stata determinata l'avidity, se IgG positivi (VIDAS-Toxo-IgG Avidity, BioMérieux).

Risultati. 97 campioni (2.03%) sono risultati ELISA positivi e sono stati suddivisi in 2 gruppi. Gruppo A (D.O. campione/cut off ≥ 1.75): 47 (48.5%). Gruppo B (rapporto $\geq 1, < 1.75$): 50 (51.5%). Con test ELFA 46 campioni (97.8%) del gruppo A e 29 (58%) del gruppo B sono risultati positivi o dubbi ($p < 0.01$). 20/44 (45.5%) del gruppo A e 34/40 (85%) del gruppo B presentavano avidity forte. 24 (54.5%) del gruppo A e 6 (15%) del gruppo B avidity debole o intermedia ($p < 0.01$). In 7 soggetti (IgM deboli) negativi per la ricerca delle IgG un follow up ha evidenziato la persistenza delle IgM a basso titolo per 1-9 mesi in 3 casi, e la scomparsa in 2-5 mesi in 4 casi senza mai la comparsa di IgG. In 8 soggetti con IgM deboli e avidity forte erano presenti nei nostri archivi dati comprovanti la presenza di IgM risalente a 2-7 anni prima.

Conclusioni. Dai dati risulta che solo il 15% dei soggetti con IgM deboli potevano avere un'infezione recente rispetto al 54.5% di soggetti con IgM ad alto titolo. I rimanenti sono il retaggio di un'infezione pregressa avvenuta anche a distanza di anni. In assenza prolungata di IgG una positività a basso titolo per le IgM è suggestiva di fenomeni di aspecificità.

065

SONDAGGIO CONOSCITIVO COPROPARASSITOLOGICO IN UNA ZONA ANDINA DELLA CORDILLERA BLANCA, PERU'

Crotti D. *, Basileo M. °, Crotti S. ^, D'Annibale M. L. **
La Torre G. °

L. P. in Parassitologia e Microbiologia Medica;

° Laboratorio Analisi, Ospedale Mama Ashu, Chacas (Asunción), Ancash, Perù;

^ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia;

** Struttura Complessa di Microbiologia, Azienda Ospedaliera di Perugia

Introduzione. Presupposto di tale indagine preliminare è stato quello di prendere visione della limitatezza ed inadeguatezza delle modalità diagnostiche operative in tema di parassitosi intestinali nel laboratorio di un Ospedale Missionario in una zona andina del Perù e cogliere le principali problematiche al riguardo anche da un punto di vista epidemiologico. Scopo è stato pertanto quello di impostare una diagnostica più consona e razionale e fotografare nell'arco di un brevissimo lasso di tempo quali fossero i principali agenti parassitari circolanti in tale area geografica.

Metodi. Nel corso di 5 giorni consecutivi (dal 27 febbraio al 3 marzo 2006) 91 campioni fecali di altrettanti soggetti, ricoverati e afferenti in quel periodo all'ambulatorio dell'Ospedale "Mama Ashu" di Chacas (Asunción), Ancash, Peru', sito a oltre 3000 mt di altitudine, sono stati analizzati per un esame copro-parassitologico standard (ECPS), previo consenso informale. Trattavasi di 38 bambini e 53 adulti.

L'ECPS consisteva in:

- a) osservazione macroscopica;
- b) osservazione microscopica diretta;
- c) osservazione microscopica dopo arricchimento formolo-etero/etilacetato (FEA);
- d) microscopia ottica dopo colorazione di Giemsa.

Risultati.

parassita	BAMBINI (38)		ADULTI (53)		TOTALI (91)	
<i>G. duodenalis</i>	8	21.1%	3	5.7 %	11	12.1%
<i>D. fragilis</i>	11	28.9%	17	32.1%	28	30.8%
<i>B. coli</i>	0	-	1	1.9 %	1	1.1 %
TOTALE						
PROTOZOI	19	50.0%	21	39.6 %	40	44.0%
PATOGENI						
<i>A. lumbricoides</i>	7	18.4%	7	13.2%	14	15.4%
<i>T. trichiura</i>	1	2.6 %	1	1.9%	2	2.2%
<i>E. vermicularis</i>	1	2.6 %	0	-	1	1.1%
<i>F. hepatica</i>	0	-	1	1.9 %	1	1.1%
<i>H. nana</i>	2	5.3 %	1	1.9 %	3	3.3
TOTALE						
ELMINTI	11	28.9 %	10	19.9%	21	23.1%
PATOGENI						
Negativi	13	34.2 %	17	32.1%	30	33.0%
Protozoi						
non patogeni	5	13.2 %	10	18.9%	15	16.5%

Conclusioni. In parte si conferma quanto non ufficialmente segnalato negli ultimi 6 mesi e nel corso degli anni, con la netta prevalenza, tra gli elminti, dell'ascaridiasi, mentre in parte si evidenzia come l'applicazione del FEA abbia aumentato le positività sia di parassiti già reperiti all'esame diretto sia di parassiti inizialmente non evidenziati, e come l'utilizzo della colorazione di Giemsa abbia permesso di individuare *D. fragilis*, mai segnalata prima, come il protozoo ed il parassita in assoluto più frequente (30.8%).

066

OPISTHORCHIASI AL LAGO TRASIMENO (PG): DESCRIZIONE DI UN SECONDO EPISODIO EPIDEMICO

D'Annibale M. L. [^], Crotti D. ^{*}, Crotti S. [°]

[^]Struttura Complessa di Microbiologia,

Azienda Ospedaliera di Perugia;

^{*}L.P. in Parassitologia e Microbiologia Medica, Perugia;

[°] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Introduzione. Presupposto di tale presentazione è la descrizione nel 2004 di un primo episodio di opisthorchiasi occorso a un cop-pia che aveva consumato tinche marinate a freddo di provenienza dal lago Trasimeno (PG). Scopo attuale è quello di segnalare un secondo episodio epidemico di opisthorchiasi occorso questa volta a 8 soggetti in seguito al consumo sempre di pesce marinato (tinche, carpe, persico) di provenienza autoctona.

Metodi. Nel gennaio 2006 ad un giovane adulto viene prescritto un esame coproparassitologico standard perché affetto da ipereosinofilia e blandi disturbi intestinali. L'esame viene condotto con microscopia diretta, dopo arricchimento formolo-etilacetato (FEA), colorazione di Giemsa (su 3 campioni fecali). Le feci del soggetto risultano positivo per uova

di *Opisthorchis* spp. Vengono così invitati anche gli altri 7 convenuti a quel pranzo in un ristorante sull'Isola Maggiore al lago Trasimeno (ai primi di novembre 2005) a sottoporsi ad un esame coproparassitologico, sebbene apparentemente asintomatici. Al contempo vengono eseguite 10 esami coproparassitologici ad altrettanti campioni di feci feline raccolte sull'Isola Maggiore del lago, ove vivono decine di gatti randagi, e vengono svolte adeguate indagini anamnestiche-epidemiologiche al riguardo.

Risultati. Tutti gli 8 soggetti sono risultati positivi per la presenza di uova di *Opisthorchis* spp. nei rispettivi campioni fecali. In 3 casi le uova furono osservate già all'attento esame diretto (negli altri 5 solo dopo FEA).

Tra i campioni di feci dei gatti, in 4 casi (40%) si osservarono le medesime uova di *Opisthorchis* spp. (in 2 casi il numero di uova appare piuttosto elevato).

La diagnosi microscopica si basò sulla morfologia, sulle dimensioni e sulle caratteristiche specifiche delle uova medesime.

L'indagine epidemiologica avrebbe confermato la provenienza dal Lago Trasimeno stesso di tutti i pesci consumati in quell'occasione.

Conclusioni. Sulla base della precedente esperienza e di tali risultati (sia nell'uomo che nel gatto), sulla conoscenza dell'epidemiologia nota relativa a tali trematodi (*Opisthorchis/Clonorchis*), ed in relazioni ad indagini ittiche ed ambientali ancora in corso, siffatte uova sono state identificate come appartenere al trematode *Opisthorchis felinus*, confermandosi quanto un paio d'anni addietro osservato e riportato.

067

EPIDEMIOLOGIA DELLA MALARIA A PARMA NEL PERIODO 2002-2006

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

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

Introduzione. La malaria è oggi la più comune malattia d'importazione nel nostro Paese: 7.138 casi sono stati notificati al Ministero della Salute nel periodo 1995-2002 prevalentemente causati da *Plasmodium falciparum* seguito da *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. In questo studio riportiamo la prevalenza dei casi di malaria d'importazione a Parma nel periodo 2002-2006.

Metodi. Trecentosessantatré campioni di sangue di pazienti con sospetta malaria (188 maschi, 175 femmine, 224 stranieri e 139 italiani), provenienti soprattutto dall'Africa, sono stati sottoposti ad osservazione microscopica previa colorazione con arancio di acridina e Giemsa e alla ricerca degli antigeni di plasmodi. Il DNA estratto da ciascun campione è stato saggiato con metodi molecolari (nested e/o Real-time PCR specie-specifica) aventi come bersaglio il gene 18S-DNA dei plasmodi.

Risultati. L'esame microscopico ha svelato 91 casi (21%) di infezione da plasmodi: 76 *P. falciparum* (83.5%), 6 *P. vivax* (6.6%), 6 *P. ovale* (6.6%) e 3 *Plasmodium* spp. (3.3%). I metodi molecolari ne hanno invece rivelati 97 (26.7%): 77 *P. falciparum* (79.3%), 5 *P. vivax* (5.1%), 10 *P. ovale* (10.3%), 2 *P. malariae* (2%), 1 *P. falciparum* + *P. ovale* (1%), 1 *P. falciparum* + *P. malariae* (1%), 1 *P. falciparum* + *P.*

ovale+ *P. malariae* (1%).

Conclusioni. I nostri risultati dimostrano che nel nostro territorio la malaria è una malattia d'importazione con rilevante impatto epidemiologico e che *P. falciparum* è la specie più frequentemente riscontrata (79.3%-83.5%), in accordo con i dati nazionali ufficiali dell'Istituto Superiore di Sanità.

I metodi molecolari hanno evidenziato una maggiore prevalenza dei casi d'infezione da plasmodi (26,7%), sottostimata dalle indagini microscopiche (21%) verosimilmente a causa della loro minore sensibilità. Inoltre, ci hanno consentito di ottenere dati più precisi, svelando un numero maggiore di infezioni diverse da *P. falciparum*: in particolare casi d'infezione da *P. ovale* e *P. malariae* e, soprattutto, casi di infezioni miste altrimenti non evidenziati.

068

THREE CASES OF OPHTHALMOMYIASIS EXTERNA BY SHEEP BOTFLY OESTRUS OVIS IN ITALY

Dono M.¹, Bertonati MR.², Poggi R.³, Fedeli F.⁴, Via F.¹, Roncella S.⁴ and Battolla E.¹

¹U.O. Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche and

⁴U.O. Anatomia ed Istologia Patologica, Osp. S. Andrea, La Spezia;

²Ophthalmologist, Osp. S. Nicolò, Levanto;

³Museo Civico di Storia Naturale "G. Doria", Genova.

Introduction. The sheep botfly larvae of *Oestrus ovis* usually infest nasal and paranasal cavities of goats and sheep. Accidentally, larvae can be deposited into human eyes and infestation is known as external ophthalmomyiasis (OM). This very rare condition is more common among people living close to farming communities (like shepherds).

Here, we report three cases of OM externa occurred in patients living in La Spezia province (*Le Cinque Terre*).

Methods. Larvae were removed from patients' eyes and identified by light microscopy examination. The whitish larvae displayed the body segments, the two typical anterior hooks (sharply curved) and several spikes along the body characteristic of the first stage larva of botfly *Oestrus ovis*.

Results. In the summer 2004, three people presented to the emergency room, reporting symptoms like pain, burning, itching, and resembling a condition similar to conjunctivitis. At a slit lamp examination, the physician noted various larvae with a white transparent body of about 1 mm. These were firmly attached to the conjunctiva and consequently, removed by using fine forceps and sent to the laboratory for identification. The patients were treated with antibiotics to prevent secondary bacterial infections and re-examined to rule out other complications or existence of additional larvae.

Conclusions. Cases of myiasis have been described all around the world and also in different Italian regions (Sicily, Tuscany, Umbria, Abruzzo) but infestation affected primarily farming people living in close contact with sheep. So far, it is the first time that three cases of ophthalmomyiasis are described in Liguria region and among people with no contact with farm animals or recent travels through sheep farming areas. We believe that, although the OM is an uncommon condition in Italy, it is important a prompt recognition and treatment of occasional infestation to improve patient care and reduce the potential complications (penetration of

larvae into the ocular globe).

069

PREVALENZA DI INFEZIONI DA DIENTAMOEBIA FRAGILIS IN POPOLAZIONE SINTOMATICA

Arzese A.^{1,2}, Beltrame A.¹, Fabbro E.², Romano K.¹, Zamparini E.¹, Viale P.¹

¹Clinica di Malattie Infettive,

Policlinico Universitario a Gestione Diretta, v. Colugna 50, 33100 UDINE

²Cattedra di Microbiologia,

Dipartimento di Ricerche Mediche e Morfologiche,

Università degli Studi di Udine, p.le Kolbe 3, 33100 UDINE

Introduzione. L'infezione enterica da *Dientamoeba fragilis*, sottostimata e misconosciuta nel suo significato patogeno per numerosi decenni dopo la caratterizzazione dell'agente come protozoo flagellato, è più di recente oggetto di studi biologici e clinici.

Epidemiologicamente è stata evidenziata la diffusione a livello mondiale, e *D. fragilis* viene oggi annoverato tra gli agenti di diarrea, con sintomatologia simile alla giardiasi; tuttavia, rimangono ancora perplessità sulla modalità di trasmissione dell'agente, e clinicamente viene esplorata la possibile associazione con altre patologie gastro-enteriche ad etiologia incerta (colite allergica, sindrome da colon irritabile, rettocolite ulcerosa).

In questo studio viene valutata la prevalenza di infezione da *D. fragilis* in una popolazione sintomatica con indicazione all'esame coproparassitologico.

Metodi. Da maggio 2004 a maggio 2006 su 210 soggetti afferenti alla Clinica di Malattie Infettive, per sospetta parassitosi enterica veniva applicato a 652 campioni di feci il protocollo standard per l'esame coproparassitologico su raccolta seriata (minimo 3 campioni) con esecuzione di esame microscopico diretto e dopo arricchimento/concentrazione con formalina-etilacetato, saggio complementare per *Strongyloides* spp (Baermann test/culturale), ed esame microscopico dopo colorazione di Giemsa/Giemsa-Wright su minimo 2 campioni di feci fresche, oltre alla colorazione tricromica (Wheatley's trichrome stain) ed acido-alcool resistente (Kinyoun's stain), applicate di routine come colorazioni permanenti.

Risultati. Trofozoiti con morfotipo riferibile a *D. fragilis* erano individuati sia con Giemsa stain, sia con colorazione tricromica in 3 casi clinici (1.4%), e come unico agente di parassitosi: due soggetti, madre e figlia adolescente, di nazionalità italiana con sintomatologia enterica di tipo diarroico persistente, ed una paziente, al rientro dal paese d'origine (Colombia) con sospetta rettocolite ulcerosa.

Conclusioni. La prevalenza riscontrata in questo studio, simile a quella riportata in alcuni studi recenti, ma che va a porsi in un range molto ampio, e la complessità/gravità di alcune patologie a sospetta etiologia da *D. fragilis* motivano senz'altro approfondimenti clinici e diagnostici per l'individuazione del patogeno.

070

DIAGNOSI E TERAPIA DELL'ANISAKIDOSI MEDIANTE ENDOSCOPIO. DESCRIZIONE DI TRE CASI IN ABRUZZO.

Fazii P.¹, Neri M.², Bucci E.³, Pistola F.¹, Laterza F.², Colagrande E.¹, Cosentino L.¹, Caldarella M.P.², Clerico L.¹, Stella M.¹, Pelatti A.¹, Riario Sforza G.¹

¹U.O. di Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia P.O. "Spirito Santo", Via Fonte Romana, 8, 65124 Pescara

²Dip. Medicina e Scienza dell'Invecchiamento, Sez. di Med. Interna e Gastroenterologia, Università "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara, Via dei Vestini, 63100 Chieti

³U.O. di Laboratorio Analisi P.O. "S.S. Annunziata", Via dei Vestini, 63100, Chieti

Introduzione. L'anisakidosi è una parassitosi causata dall'ingestione accidentale di larve vive e vitali di anisakidi appartenenti soprattutto al genere *Anisakis*.

L'uomo contrae l'infestazione attraverso i cibi a base di pesce crudo o poco cotto. L'anisakidosi è particolarmente diffusa in quei Paesi ove si è soliti mangiare prodotti ittici crudi (Giappone, Corea, ecc.); in Italia numerosi casi sono stati segnalati soprattutto in Puglia ed in Abruzzo.

I sintomi sono essenzialmente a carico dell'apparato gastroenterico e si è soliti distinguere una forma gastrica, una intestinale ed una complicata.

La diagnosi si esegue mediante l'osservazione diretta del parassita; utile, talora, può essere la ricerca degli anticorpi specifici anti-*Anisakis*.

La terapia farmacologica non è consigliabile in quanto inefficace; utile è invece la terapia chirurgica dei casi complicati; l'endoscopia a fibre ottiche dotato di pinze per biopsia, risulta utile non solo nella diagnosi ma anche nella terapia della parassitosi.

Casi clinici. Descriviamo tre casi particolari di anisakidosi pervenuti alla nostra osservazione negli ultimi 4 anni.

Nel primo caso si è trattato di una impiegata di Chieti di 32 anni che presentava epigastralgia; negli altri due casi (giornalista di 66 anni di Pescara e commerciante in prodotti ittici, quarantacinquenne, di Popoli – PE) invece non vi erano sintomi soggettivi: ambedue i pazienti, infatti, avevano eseguito, rispettivamente, una gastroscopia ed una colonscopia per controllo.

In tutti e tre i casi gli endoscopisti sono riusciti ad osservare larve vive di anisakidi impegnate con la regione cefalica nella mucosa ed ad asportarle mediante l'endoscopia stesso. I pazienti che, avevano mangiato alici marinate nei giorni precedenti l'esame endoscopico, presentavano anche anticorpi anti-*Anisakis* a titolo molto-elevato.

Si è voluto segnalare questi casi non solo a fini epidemiologici, ma anche per sottolineare l'utilità dell'endoscopia nella terapia di questa parassitosi.

071

RISULTATO DISCORDE TRA DUE RAPID DIAGNOSTIC TEST (RDT) PER MALARIA NEL RISCONTRARE UNA PARASSITEMIA SOSTENUTA DA *PLASMODIUM MALARIAE*

Grande R.¹, Maraschini A.¹, Torgano G.G.²

¹Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia,

²U.O. Medicina d'Urgenza - Fondazione I.R.C.C.S. Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli, Regina Elena - Milano.

Introduzione. I Rapid Diagnostic Tests (RDT) per la ricerca di *P.falciparum* su sangue periferico hanno una elevata specificità e sensibilità, ma per gli altri plasmodi responsabili della malaria nell'uomo le performances sono più basse. Sono facilmente eseguibili e forniscono una risposta entro 15 minuti.

Nel nostro Laboratorio, a seguito di un consistente aumento di richieste per la ricerca di *Plasmodium spp* su sangue periferico, si è ritenuto opportuno adottare nel pannello di esami da eseguire in urgenza un RDT per la ricerca di antigeni di *Plasmodium falciparum*, *vivax*, *ovale*, *malariae* quale supporto per l'operatore nell'accertamento diagnostico della malaria.

Il test viene eseguito unitamente alla ricerca microscopica diretta su striscio sottile e goccia spessa.

Metodi e risultati. Cinque campioni di sangue periferico provenienti da pazienti cui è stato richiesto l'accertamento nel circolo periferico di plasmodi malarici sono stati valutati con due RDT: il test Malaria Now commercializzato in Italia dalla ditta Promesan e il test Malaria Screen Rapid Test della ditta EQUIPAR.

Entrambi sono test immunocromatografici: il primo utilizza come antigene l'HRP-2 (Histidin Rich Protein) specifica per *P.falciparum* e l'enzima aldolasi specifico di genere per le altre specie di plasmodio, mentre il secondo utilizza tre antigeni: HRP-2 per *P.falciparum*, l'enzima LDH specifico per *P.vivax* e l'enzima pLDH generico per le altre due specie di plasmodi. Nel corso della valutazione abbiamo riportato una discordanza di risultato tra i due test nel campione di un solo paziente.

H.H., marocchino, si presenta presso il Pronto Soccorso della Fondazione con iperperessia; ha un'anamnesi positiva per rischio malarico. Viene effettuata una emoscopia su striscio sottile, su preparato a goccia spessa ed eseguita la ricerca immunocromatografica dell'antigene con i due RDT a disposizione.

Il test Malaria Now risulta negativo, mentre il Malaria Screen Rapid Test risulta debolmente positivo alla banda del pLDH generico (*P.ovale/malariae*). All'esame microscopico diretto viene evidenziata una parassitemia dello 0.1% causata da *P.malariae*.

Conclusioni. Questa osservazione mette in luce i limiti degli attuali RDT per l'accertamento di antigeni plasmodici su sangue periferico, che non devono mai essere usati disgiuntamente dalla ricerca diretta del parassita malarico su striscio sottile di sangue periferico e preparato goccia spessa.

072

TOXOPLASMOSI OCULARE IN LINFOMA

Grandi G.²; Bay A.¹; Albanesi T.²; Melchio P.²; Trasendi P.²;

¹ Divisione Glaucomi - Ospedale Oftalmico, Via Juvarrà 19, 10100 Torino.

² Servizio di Patologia Clinica - Ospedale Oftalmico, Via Juvarrà 19, 10100 Torino.

Paziente giunta in P.S. oculistico dell'Ospedale Oftalmico di Torino per alterazioni del visus. Viene posta diagnosi di vitrite dell'occhio sx. L'anamnesi patologica segnala presenza di linfoma non Hodgkin diffuso B di grandi cellule stadio IA diagnosticato da circa un anno. La paziente è stata sottoposta a chemioterapia R. CHOP. All'ecografia oculare si riscontrano disomogeneità vitreali dell'occhio sx.

L'esame fluorangiografico segnala un focolaio di corioretinite attivo fortemente suggestivo di lesione toxoplasmica. Gli esami sierologici per la toxoplasmosi danno i seguenti risultati: IgG negative (Bio Merieux Vidas), IgM 1,33 (positive > 0,65) (Bio Merieux Vidas), Ig Totali in immunofluorescenza indiretta < 10 UI/ml (negative). Per confermare la specificità delle IgM in Elfa viene eseguito il test IgM ISAGA = 6 (positività dubbia).

Possibili interpretazioni:

1. quadro sierologico di toxoplasmosi atipico a causa della neoplasia
2. quadro sierologico non significativo.

Il centro di parassitologia dell'Hopital de la Croix Rousse di Lione, col quale collaboriamo da anni, ci segnala come più probabile un quadro di toxoplasmosi atipico.

Sulla base del quadro fluorangiografico fortemente suggestivo di lesione da toxoplasma la paziente viene trattata con Trimetoprim sulfametossazolo e con Betametasone fosfato disodico. Si decide di ricontrollare il quadro sierologico dopo un mese. Questi i risultati: IgG negative, IgM 1,71, IgM ISAGA 12 (positività massima), Ig Totali in immunofluorescenza indiretta dubbie / debole positività. La netta positività delle IgM ISAGA e una debole positività in IFI, associate ad un miglioramento in seguito a terapia confermano la diagnosi di focolaio di corioretinite toxoplasmica con sierologia atipica causata dalla neoplasia di base. Un pannello di esami sierologici di I e II livello, un dialogo costruttivo fra colleghi di branche diverse e la collaborazione con altri centri di riferimento europei permette una diagnosi corretta.

073

LEISHMANIOSI VISCERALE IN PAZIENTE IMMUNOCOMPETENTE: CASO CLINICO

Nisticò S.¹, Leone R.A.¹, Minchella P.¹, Potente G.I.¹, Borelli A.¹, Caruso V.¹, Caruso D.¹, Camerino M.¹, Carlei M.I.¹, Folino C.¹, Piccoli M.¹, Nicolazzo A.¹, Berardelli G.², Petronio A.², Luciano A.¹

¹U.O. Microbiologia e Virologia,

²U.O. Malattie Infettive,

Azienda Sanitaria N. 6, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Introduzione. Le leishmaniosi, infezioni causate da protozoi parassiti del genere *Leishmania*, possono clinicamente manifestarsi sotto tre forme: leishmaniosi cutanea, mucocutanea e viscerale. Le prime due possono essere considerate manifestazioni a decorso benigno, mentre la forma viscerale ha manifestazioni sistemiche gravi e si presenta generalmente nei soggetti immunocompromessi. Le forme flagellate del protozoo (promastigoti) vengono trasmesse all'uomo tramite puntura di artropodi vettori e si moltiplicano nei macrofagi come forme aflagellate (amastigoti). In Italia la leishmaniosi è endemica in tutte le regioni tirreniche, nel basso Adriatico e nelle isole. Il ceppo più comunemente presente in queste aree è rappresentato da *Leishmania infantum*. Scopo del lavoro è descrivere il caso di un paziente di sesso maschile di 41 anni, presentatosi all'osservazione dell'U.O. di Malattie Infettive, che da circa quattro mesi lamentava una sintomatologia caratterizzata da calo ponderale (circa 20 kg), febbre, colica serotina, astenia e sudorazione notturna. Gli esami ematologici, prontamente eseguiti in prima giornata, mostravano una marcata anemia (Hb 11 mg/dl), lievi disordini della coagulazione, aumento della VES, leucopenia (27,8% neutrofili, 59% linfociti), fosfatasi alcalina 307 UI/l, GGT 216 UI/l, AST 54 UI/l, ALT 61 UI/l; l'elettroforesi delle proteine mostrava una diminuzione dell'albumina (34,7%) ed un aumento della frazione gamma (47,9%), con un rapporto alfa/gamma di 0,53. L'esame ecografico dell'addome evidenziava un'epatomegalia. Posto il sospetto di infezione protozoaria da *Leishmania* si procedeva a prelievo sierologico per la ricerca di anticorpi anti-leishmania IgG ed anti-HIV 1/2, nonché aspirato midollare osseo.

Metodi. A) *Leishmania infantum* IgG EIA, (Ditta Novatec, distribuito da RADIM); B) AxSYM HIV 1/2 gO, metodo Meia (Ditta Abbott); C) colorazione dello striscio di aspirato midollare (metodo Giemsa).

Risultati. L'esame istologico dimostrava la presenza di numerosi elementi intraistocitari ed extracellulari morfologicamente riconducibili ad amastigoti di *Leishmania*. L'esame sierologico per la ricerca di anticorpi anti-*Leishmania* di classe IgG dava esito positivo, mentre la ricerca di anticorpi anti-HIV 1/2 ed Ag p24 dava esito negativo.

Conclusioni. Il caso descritto dimostra che, pur essendo la leishmaniosi viscerale poco frequente negli immunocompetenti, tale infezione parassitaria è da tenere sempre in considerazione per evitare quei ritardi diagnostici che potrebbero rivelarsi fatali.

074

INFESTAZIONE DA SCHISTOSOMA MANSONI: LA WESTERN BLOT PUÒ ESSERE CONSIDERATA UN TEST DI CONFERMA?

Maraschini A., Grande R., Berto M.

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia -
Fondazione I.R.C.C.S. Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli,
Regina Elena - MILANO

Introduzione. La diagnosi di Schistosomiasi è principalmente basata sulla positività della ricerca delle uova del trematode nelle feci e/o nelle urine. Nel caso di infestazione lieve lo scarso numero di uova riscontrabili nei campioni di feci o di urine e la modalità di emissione saltuaria delle stesse inficia l'esame parassitologico, legato soprattutto alla perizia dell'operatore e alla modalità di raccolta dei campioni. La ricerca anticorpale fornisce un valido sussidio diagnostico. I test commerciali disponibili sono attualmente pochissimi. In particolare la Western Blot (WB) specifica per Schistosoma è un prodotto unico, che utilizza un estratto di antigeni di *Schistosoma mansoni*.

Caso Clinico. Il nostro Laboratorio utilizza, per la diagnosi di Schistosomiasi, l'esame parassitologico delle feci raccolte a giorni alterni (almeno cinque campioni), delle urine raccolte in tre giorni consecutivi e la ricerca di anticorpi: IHA Cellognost Schistosomiasi (Dade Behring) e Schistosoma Western Blot IgG (LDBIO Diagnostics). Si utilizza la metodica WB come test di conferma della positività di IHA. Portiamo all'attenzione il caso di E.A., paziente egiziano seguito presso l'ambulatorio di Gastroenterologia della Fondazione.

Il paziente ha eseguito sia l'accertamento parassitologico sulle feci che la ricerca di anticorpi per la diagnosi di schistosomiasi. Sono state evidenziate uova di *S. mansoni* in bassa carica (un solo campione positivo su sei raccolti) e l'esame sierologico è risultato positivo a IHA con titolo: 1/64. La WB di conferma è risultata negativa (una sola banda positiva, 120 Kd). Il risultato è stato confermato da un laboratorio di riferimento (Laboratorio di Parassitologia - Servizio di Virologia - I.R.C.C.S. Policlinico S.Matteo - Pavia).

Conclusioni. Questo caso pone un duplice interrogativo:

- la Western Blot può essere considerata un test di conferma?
- è corretto che il laboratorio accetti una richiesta di ricerca anticorpale senza la ricerca microscopica diretta delle feci e/o delle urine?

Il caso che proponiamo, col solo accertamento sierologico, sarebbe risultato un falso negativo.

075

CINETICA DI UN TEST DI AVIDITÀ NELLA DIAGNOSI DI TOXOPLASMO SI CONGENITA

Meroni V., Genco F., Piccoli L., Bollani L.¹, Stronati M.¹, Farina L.²

Dipartimento di Clinica di Malattie Infettive
Università degli Studi Pavia,¹ Unità Terapia Intensiva Neonatale
IRCCS Policlinico San Matteo Pavia Via Taramelli 5
27100 Pavia

²Laboratori BOUTY S p A viale Casiraghi 471
20049 Sesto San Giovanni Milano

Introduzione. Ancora oggi la diagnosi di toxoplasmosi congenita viene fatta dopo un anno di follow-up neonatale verificando la positività dei test IgG in assenza di terapia; infatti la produzione di anticorpi neonatali è mascherata dalla presenza di quelli materni e spesso ritardata dalla terapia pre- e post-natale. Scopo del lavoro è stato quello di valutare se un test di avidità eseguito alla nascita e nei primi mesi di vita fosse in grado di dare informazioni sull'infezione o meno del neonato.

Metodi. Abbiamo analizzato retrospettivamente campioni di 10 neonati infetti e 10 neonati sani alla nascita in parallelo con quelli materni e poi con almeno tre campioni prelevati nel corso del follow-up. Tutti i campioni sono stati valutati in precedenza con i tests in uso nel laboratorio: ELISA IgG IgM, IgA (Diasorin Saluggia Italia), IgG ELFA, Toxo IgM ISAGA (Biomerieux Marcy L'Etoile France), IgG IgM Western-Blot (LDBIO Lyon France) e nel corso dello studio con il test BEIA Toxo IgG Avidity (Bouty S p A Milano).

Risultati. Abbiamo potuto osservare che nei neonati non infetti l'avidità si mantiene costante con minime variazioni finché dosabile (fino alla scomparsa degli anticorpi materni). In tutti i neonati infetti, invece, abbiamo verificato un notevole aumento dell'avidità in otto campioni e una marcata riduzione in due.

Conclusioni. Questi dati preliminari indicano un possibile utilizzo del test BEIA Toxo IgG Avidity (Bouty S p A Milano) come orientamento diagnostico nella toxoplasmosi congenita.

076

VALIDITÀ DI UN TEST IGG IGM WESTERN-BLOT NELLA DIAGNOSI PRECOCE DELL'INFEZIONE CONGENITA DA *T. GONDII*

Meroni V., Genco F., Piccoli L., Bollani L.¹,
Stronati M.¹

Dipartimento di Clinica di Malattie Infettive
Università degli Studi Pavia,

¹ Unità Terapia Intensiva Neonatale
IRCCS Policlinico San Matteo Pavia
Via Taramelli 5 27100 Pavia

Introduzione. La diagnosi di toxoplasmosi congenita nel neonato a rischio asintomatico rimane a tutt'oggi un problema insoluto nonostante l'esigenza di una definizione precoce dello stato di infezione: da una parte per trattare tempestivamente i neonati infetti e dall'altra per evitare una terapia lunga e poco maneggevole a neonati non infetti. Scopo di questo studio è stato di valutare l'accuratezza diagnostica del test IgG IgM Western-blot (IgG IgM-WB LDBIO Lyon France) in uso nel nostro laboratorio da diversi anni.

Metodi. Sono stati valutati retrosopettivamente con il test IgG IgM WB (LDBIO Lyon France) 224 neonati a rischio: il campione ottenuto alla nascita in parallelo con quello materno e poi con i campioni ottenuti nei primi tre mesi di vita. Tutti i campioni sono stati analizzati in precedenza con i test in uso nel laboratorio: ELISA IgG IgM, IgA (Diasorin Saluggia Italia), IgG ELFA, Toxo IgM ISAGA (Biomerieux Marcy L'Etoile France). La diagnosi di infezione è stata fatta alla nascita in 30 neonati per la presenza di IgM e/o IgA, per i restanti 10 sulla base di un rebound anticorpale o per la positività delle IgG all'anno di vita.

Risultati.

	Isaga IgM+ELISA	WB IgG IgM	Tot
Non infetti	180	177	184
Infetti	30	38	40
Sensibilità	75%	96%	
Specificità	98%	96%	

Conclusioni. Il test in esame ci ha permesso di trattare tempestivamente (nei primi tre mesi di vita) 8 neonati infetti negativi con i tests tradizionali e di non trattare 177 neonati non infetti.

077

EPIDEMIOLOGIA DELLE PARASSITOSI INTESTINALI A PARMA NELL'ANNO 2005.

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

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

Introduzione. Le parassitosi intestinali rappresentano un rilevante problema di salute nei Paesi in via di sviluppo, mentre nei Paesi industrializzati come l'Italia la loro epidemiologia è poco nota. In questo studio riportiamo i casi di parassitosi intestinali osservati a Parma durante l'anno 2005.

Metodi. Sono stati analizzati campioni di feci di 1117 pazienti (166 stranieri e 951 italiani) pervenuti al nostro laboratorio da reparti ospedalieri e da ambulatori distribuiti sul territorio. Ciascun campione è stato sottoposto ad esame macroscopico per evidenziare consistenza, presenza di sangue, muco e/o forme adulte di elminti e ad esame microscopico per la ricerca di cisti e/o trofozoiti di protozoi e uova e/o larve di elminti. Nei campioni in esame sono stati anche ricercati antigeni di *Giardia intestinalis* e *Cryptosporidium* spp., protozoi ed elminti mediante esame colturale e, quando necessario, *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* mediante PCR specifica.

Risultati. Sono stati diagnosticati 146 casi (13,07%) di infezioni da parassiti intestinali (95 in soggetti italiani, 51 in stranieri; 19 bambini, 127 adulti).

112 erano infezioni singole causate da protozoi (87 *Blastocystis hominis* e 18 *Giardia intestinalis*), ed elminti (3 *Strongyloides stercoralis*,

2 *Taenia saginata*,

1 *Enterobius vermicularis*,

1 *Ascaris lumbricoides*).

34 erano infezioni miste: 7 *B.hominis*+*Entamoeba coli*,

4 *G.intestinalis*+*B.hominis*,

4 *S.stercoralis*+*B.hominis*,

2 *E.vermicularis*+*B.hominis*,

1 *S.stercoralis*+*B.hominis* +*Entamoeba coli*,

1 *T.trichiura* + *G.intestinalis* +*H.nana*+ *B.hominis* +

Entamoeba coli,

1 *Taenia* spp.+ *Diphyllobotrium latum*,

1 *E. histolytica*+*B.hominis*,

1 *Acanthamoeba* spp. +*B.hominis*,

1 *E.dispar*+*B.hominis*+*Entamoeba coli*,

1 *D.fragilis* +*B.hominis*,

1 *D.fragilis*+*B.hominis*+*Entamoeba coli*,

2 *G.intestinalis*+*H.nana*+*E.dispar*+*B.hominis*,

1 *G.intestinalis*+*E.dispar*+*B.hominis*,

1 *S.stercoralis*+ *H.nana*+*B.hominis*+*Entamoeba coli*,

1 *A.duodenale*+*T.trichiura* +*B.hominis*,

1 *E. histolytica*+*A.lumbricoides*,

1 *G.intestinalis*+*Taenia* spp. +*B.hominis*,

1 *Taenia* spp. + *B.hominis*,

1 *Taenia saginata*+*B.hominis*.

Conclusioni. Solo grazie all'esecuzione di un esame parassitologico completo (indagini tradizionali e molecolari) è stato possibile evidenziare che le parassitosi intestinali rappresentano una realtà epidemiologica rilevante nella nostra area, dove le precarie condizioni igieniche alimentari e/o l'immigrazione rivestire un ruolo importante.

078

WORKFLOW DIAGNOSTICO PER LA IDENTIFICAZIONE DI *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. IN CAMPIONI FECALI

Putignani L.¹; Bordi E.¹; Cacciò S.²; Paglia M.G.¹; Boumis E.¹; Petrosillo N.¹; Visca P.^{1,3}

¹Istituto Nazionale per lo studio delle Malattie Infettive, INMI, "Lazzaro Spallanzani", Roma, Italia;

²Istituto Superiore di Sanità, ISS, Roma, Italia;

³Dipartimento di Biologia, Università "Roma Tre", Roma, Italia.

Introduzione. La criptosporidiosi rappresenta una frequente causa di morbidità e mortalità in individui immunocompromessi. Dall'introduzione della terapia antiretrovirale (HAART) tale parassitosi ha registrato una considerevole diminuzione di incidenza e un limitato impatto clinico sul paziente. In Italia, il rischio relativo di morte per criptosporidiosi è diminuito del 74% tra gli individui HIV+ nel periodo 1997-1998, quando la terapia HAART ha iniziato ad essere largamente usata. Nel nostro ospedale, l'Istituto Nazionale per lo Studio delle Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani" di Roma, abbiamo nell'ultimo anno registrato otto casi di criptosporidiosi in pazienti HIV-positivi. Tale incidenza ci ha indotto a sviluppare un protocollo diagnostico per l'identificazione di infezioni da *Cryptosporidium* spp. Metodi molecolari e microscopici sono stati combinati in un "workflow" operativo per l'identificazione di specie di *Cryptosporidium* spp. in campioni fecali.

Lo scopo è stato:

- i) produrre una diagnosi riproducibile migliorando la sensibilità dei metodi di "detection" microscopica già presenti e proponendo un nuovo protocollo identificativo di specie fino ad oggi assente;
- ii) allargare la nostra conoscenza sul significato clinico ed epidemiologico di specie / genotipi/ sottotipi presenti nella comunità di HIV-positivi analizzata, attraverso un'analisi retrospettiva.

Metodi. I campioni fecali sono stati concentrati mediante acqua/etere, i preparati microscopici osservati sia a fresco che fissati. Per la genotipizzazione, sono stati messi a confronto diversi metodi di estrazione di DNA, per valutarne efficienza e resa, e sono stati usati come marcatori di "typing" i loci genici 18S rDNA, COWP e alcune sequenze microsatelliti.

Risultati. E' stato ottenuto un "morphotyping" su sporo-zoiti liberi e un utile metodo di genotipizzazione molecolare.

Conclusioni. Abbiamo sviluppato un "workflow" operativo per la "detection" e la identificazione di specie, genotipo, sottogruppo di *Cryptosporidium* spp. da campioni fecali conservati in formalina. Tale metodologia sviluppata fornisce nuovi strumenti per l'indagine di criptosporidiosi in parassitologia clinica.

079

STRONGYLOIDES STERCORALIS E PROBLEMATICHE DIAGNOSTICHE: ESPERIENZA.

Scalet G.¹, Pegoraro M.², Fontana R.¹, Stepan E.²

¹Dip. di Patologia, Sez.di Microbiologia,

Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Verona.

²Servizio di Microbiologia,

Ospedale Civile Maggiore, Az. Ospedaliera di Verona.

Introduzione. L'infestazione da *Strongyloides stercoralis* (Phylum *Nematoda*) può persistere in maniera asintomatica o paucisintomatica per anni; tuttavia in concomitanza ad un'alterazione delle condizioni immunitarie (anche di origine iatrogena) l'infestazione può evolvere in quadri di iperinfestazione: aumento del carico di larve, della loro disseminazione sistemica e, con essa, dei danni provocati dalla loro migrazione. La diagnosi, che consiste nel dimostrare la presenza di larve nelle feci, non può basarsi sulla concentrazione formolo-etere (FEA), perché essa ha una sensibilità in merito molto bassa. Al fine di ottimizzare la diagnostica di *Strongyloides stercoralis* abbiamo ritenuto opportuno, utilizzare metodiche specifiche di ricerca e questo Lavoro riporta i risultati relativi al periodo gennaio-maggio 2006.

Materiali. Sono stati selezionati 71 pazienti in base a: presenza di ipereosinofilia (>5%); disturbi intestinali in soggetti di età superiore a 50 anni (per le abitudini di un tempo di camminare a piedi nudi o lavorare la terra con le mani nude); prurito alla pelle; richiesta specifica. Tali campioni sono stati sottoposti a: FEA, arricchimento secondo Baerman, coltura su agar.

Risultati. Abbiamo rilevato la presenza di larve di *Strongyloides stercoralis* in 2 pazienti (2.8%). Di uno di questi è stato possibile seguire anche il follow-up terapeutico, utile per valutare la sensibilità dei diversi metodi impiegati. I primi 3 campioni di questo paziente risultavano positivi con tutte le metodiche applicate. Due settimane dopo il primo ciclo di terapia (Albendazolo 400 mg bis in die per 2 giorni) la concentrazione secondo Baerman e la coltura si mantenevano positive, mentre FEA ha permesso di reperire solo rari esemplari larvali dopo osservazione di tutto il sedimento. Due settimane dopo il secondo ciclo di terapia l'arricchimento specifico e la coltura sono risultati ancora positivi in due campioni su tre, mentre FEA negativo in tutti. In seguito al terzo ciclo terapeutico i campioni della paziente risultavano negativi a tutti i metodi utilizzati.

Conclusioni. Riteniamo utile l'impiego di tecniche specifiche per la ricerca di *Strongyloides stercoralis* perché più sensibili nel caso di bassa carica parassitaria o follow-up terapeutico. La coltura su agar ci sembra più agevole da eseguire rispetto all'arricchimento secondo Baerman nonostante necessità dell'allestimento di almeno 5 piastre per campione ed un'attenta osservazione microscopica.

080

VALUTAZIONE DEL DOSAGGIO ABBOTT REAL-TIME HIV-1

Sestilli P.¹, Vecchi M.¹, Marinelli K.¹, F.R. Pulvirenti², Bagnarelli P.¹

¹Laboratorio di Virologia, Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche, Ancona.
²Abbott Molecular, Roma

Introduzione. Abbiamo valutato le prestazioni del nuovo dosaggio Abbott Real-Time HIV-1 RNA quantitativo basato su estrazione automatica e chimica non esonucleasica (strand-displacement probe). Questo formato dovrebbe garantire robustezza nei confronti di eventuali "mismatches" presenti nella regione di ibridizzazione del probe. Il range dinamico del test (protocollo con volume iniziale di 1 mL) è compreso tra 40 e 10⁷ copie/mL. Lo studio è stato eseguito con volume iniziale di 0,5 mL (sensibilità 75 copie/mL). **Metodi.** Sono stati analizzati 79 campioni retrospettivi da 60 pazienti con infezione da HIV, il cui monitoraggio della carica virale era stato effettuato con il test b-DNA v.3 (Bayer). **Risultati.** Considerando il limite di sensibilità di 75 e 50 copie per Abbott e b-DNA rispettivamente, la concordanza qualitativa dei dosaggi era pari al 93,7% (74/79) con 3 risultati Abbott positivi/b-DNA negativi (range 80-154 copie/mL) e 2 bDNA positivi/Abbott negativi (277 e 811 copie/mL). Vi erano inoltre 3 campioni con risultato Abbott <75 copie/mL ma con target rilevato, che erano <50 copie/mL con b-DNA. Per i 59 campioni quantificabili con entrambi i metodi, la retta di regressione lineare tra i valori Abbott (y) e b-DNA (x) aveva equazione $y = 0,921x + 0,573$ ($r = 0,882$). Il 71% e il 93% dei campioni mostrava una differenza compresa entro 0,5 ed 1,0 log rispettivamente, con una differenza media Abbott-bDNA di 0,27 log ($DS = 0,48 \log$). Analizzando separatamente i campioni in base alla provenienza geografica, differenza media e coefficiente di correlazione r erano 0,12 log/0,834 per i soggetti di nazionalità italiana e di 0,41 log/0,967 per quelli non italiani (in prevalenza africani). **Conclusioni.** Il dosaggio Abbott Real-Time ha mostrato una buona correlazione ed una sostanziale equivalenza con il test b-DNA v.3. La differenza media dei valori osservati sembra essere influenzata dalla provenienza geografica dei campioni.

081

SVILUPPO DI UNA PCR QUANTITATIVA COMPETITIVA PER LA DETERMINAZIONE DELLA CARICA VIRALE DEL CITOMEGALOVIRUS E CONFRONTO CON L'ANTIGENEMIA, LA VIREMIA E IL NASBA

¹Bergallo M., ¹Costa C., ¹Merlino C., ¹Forgnone F., ¹Piasentin E., ¹Negro Ponzi A., ²Segoloni G. P., ¹Cavallo R.

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, Laboratorio di Virologia, Università di Torino;

²Dipartimento di Medicina Interna, Unità Trapianto Rene, Ospedale Molinette, Torino.

Introduzione. L'infezione da HCMV rappresenta la princi-

pale causa di morbidità e mortalità in seguito a trapianto renale. Le principali tecniche di diagnosi virologica sono: la dimostrazione diretta dell'antigene tardivo pp65 dell'HCMV nei granulociti polimorfonucleari circolanti (PMNL) (Antigenemia) e la dimostrazione dell'antigene immediato-precocce p72 nei fibroblasti di polmone embrionario umano infettati con i granulociti circolanti (Viremia). Sono state inoltre introdotte tecniche di biologia molecolare per la dimostrazione degli acidi nucleici virali nel sangue periferico: la PCR quantitativa per la dimostrazione della carica virale nel sangue periferico e la dimostrazione degli RNA messaggeri (m-RNA) nei leucociti circolanti.

Metodi. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di sviluppare una PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR) per la valutazione della carica virale dell'HCMV, basata sulla co-amplificazione del DNA bersaglio e di un competitore, con funzione di standard interno.

Sono state effettuate prove di validazione del sistema bersaglio-competitore e la quantificazione del DNA dell'HCMV è stata effettuata mediante analisi densitometrica delle migrazioni elettroforetiche.

Questa metodica validata è stata quindi utilizzata per quantificare l'HCMV-DNA in 40 pazienti (28 maschi e 14 femmine) sottoposti a trapianto renale.

Tale approccio diagnostico in questi pazienti è stato infine correlato con altre metodiche utilizzate nel nostro laboratorio: l'antigenemia, la viremia e la ricerca dell'mRNA-pp67 mediante Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA).

Risultati. L'elaborazione statistica dei nostri dati ha permesso di rilevare una correlazione significativa tra il numero di PMNL positivi all'antigenemia e il numero di copie di genomi virali e tra la rilevazione dell'mRNA-pp67 e la carica virale e non significativa tra la viremia e la carica virale.

Conclusione. In conclusione, nella nostra esperienza, l'impiego della QC-PCR da noi elaborata, affiancata all'antigenemia, può rappresentare un'ulteriore tecnica quantitativa per diagnosticare l'infezione attiva da HCMV in modo da iniziare il trattamento antivirale e monitorarne gli effetti nei pazienti immunodepressi.

082

VIRUS DI EPSTEIN-BARR E LINFOMI PRIMITIVI CUTANEI: VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE MEDIANTE PCR QUANTITATIVA-COMPETITIVA (QC-PCR) SU BIOPSIA

Bergallo M., Costa C., Novelli M.*, Ponti R.*, Fierro M.T.*, Margio S., Bernengo M.G.*, Merlino C., Cavallo R.

Dip. Sanità Pubbl. e Microbiol., Lab. Virologia,

* Dip. Scienze Biom. Oncol. Umana, Sez. Dermatol., Lab. Immunopatol. Cutanea; Università di Torino

Introduzione. La micosi fungoide (MF) è il più frequente linfoma primitivo cutaneo a cellule T (CTCL) epidermotropo, generalmente confinato alla cute e con andamento clinico spesso indolente, mentre la sindrome di Sezary (SS) è un CTCL sistemico con prognosi nettamente peggiore. Per la loro eziopatogenesi, ancora ignota, sono stati suggeriti fattori genetici, ambientali e infettivi. Recentemente retrovirus quali HTLV-I e herpesvirus umani sono stati coinvolti sia per

la loro potenzialità di trasformazione oncogena diretta, sia perché capaci di infettare le cellule T e stabilire uno stato di latenza nei tessuti dell'ospite. Alcuni studi molecolari sul ruolo del virus di Epstein-Barr (EBV) nell'eziopatogenesi dei CTCL, hanno portato a risultati controversi anche a causa della diversa sensibilità delle tecniche impiegate.

Metodi. In questo lavoro è stata indagata retrospettivamente la presenza e l'eventuale carica virale di EBV in biopsie cutanee di pazienti con MF e SS utilizzando una PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR) altamente sensibile (1-10 copie di EBV-DNA/reazione) messa a punto nel Laboratorio di Virologia. Tale metodica prevede la costruzione di una curva di taratura mediante l'utilizzo di uno standard esterno, un controllo interno di amplificazione e l'analisi densitometrica delle bande di amplificazione. Sono stati utilizzati campioni congelati di DNA di 17 pazienti con MF (11 M, 6 F; età mediana 63 anni, range 14-84), 4 con MF evoluta in linfoma ad alto grado (2 M, 2 F, età mediana 74 anni, range 59-82), 10 con SS (3 M, 7 F, età mediana 72 anni, range 46-84). Tutti i casi di MF e SS presentavano un riarrangiamento clonale dei geni del T Cell Receptor (TCR) catena γ . Come controllo sono stati esaminati i campioni di 8 pazienti con dermatosi cutanee reattive (4 M, 4 F, età mediana 64,5, range 33-79).

Risultati. Nessuno dei 21 pazienti con MF è risultato positivo per EBV-DNA. Nella SS, invece, erano positivi per EBV-DNA 7 pazienti su 10 (70%) con una carica media di 313,4 copie genomiche/ μ g di DNA estratto (range 1-2160 copie). In nessun paziente del gruppo di controllo è stata riscontrata la presenza di EBV-DNA.

Conclusioni. Nella nostra casistica appare una differenza altamente significativa tra MF e SS per quanto riguarda la positività per EBV-DNA nelle biopsie cutanee. Le differenze con i dati della letteratura, soprattutto per la MF, sono da valutare dal punto di vista delle tecniche impiegate. L'elevata percentuale di positività per EBV-DNA da noi riscontrata nella SS avvalorata i dati di letteratura che suggeriscono la rilevanza prognostica del riscontro del genoma di EBV nella cute, probabilmente correlato con un marcato deficit immunitario nel corso di forme severe di SS.

083

VALUTAZIONE IMPLEMENTAZIONE TORCH SU IMMULITE 2000 E CORRELAZIONE CMV IGM VERSO COBAS CORE II

Bernardi E., Pedroni M., Cocchi G., Ballerini C., Milanesi B.

Laboratorio Patologia Clinica, A.O. Desenzano (BS)
PPOO: Desenzano, Manerbio, Gavardo.

La finalità ad operare per il miglioramento della Qualità globale dell'Organizzazione dei Laboratori Aziendali, minimizzando l'impegno di personale e i costi di gestione mantenendo inalterata la qualità del dato, ci ha indotti ad implementare su Immulite 2000 (prodotto da DPC, distribuito da Medical Systems), sul quale già venivano effettuati dosaggi ormonali e marcatori tumorali, le ricerche anticorpali del complesso ToRCH prima eseguite su Cobas Core II (Roche). La comparazione tra i due strumenti eseguita per valutare la validità analitica dei test su Immulite ha fornito risultati sovrapponibili a quelli segnalati sulle schede tecniche dei metodi; abbiamo pertanto limitato l'esposizione ai risultati del test CMV IgM poiché di recente disponibilità.

I campioni scelti divisi in quattro gruppi secondo protocollo DPC:

1°-286 sieri di donne gravide scelti a caso, esaminati per CMV IgM su Immulite vs. Cobas. Risultati discrepanti riesaminati con Vidas (BioMérieux).

2°-34 campioni retrospettivi con IgM positive da infezione acuta da CMV preselezionati con Cobas, testati con Immulite; risultati discrepanti rianalizzati con entrambi i metodi.

3°-63 sieri retrospettivi con IgG positive, IgM negative preselezionati con Cobas.

4°-20 sieri con presenza di fattore reumatoide, 20 campioni positivi per IgM di EBV o Toxo.

E' stata calcolata: concordanza tra metodi, specificità, sensibilità relativa, valori predittivi positivi e negativi. I campioni positivi per fattore reumatoide ed EBV-Toxo IgM sono stati valutati separatamente in uno studio delle interferenze. Il nuovo kit CMV IgM DPC ha rivelato vs. Cobas Core: agreement 98,7%, sensibilità relativa 87,5%, specificità relativa 100%, PPV 100%, NPV 98,6%.

Possiamo concludere che le performance analitiche dei due Sistemi si sono dimostrate sovrapponibili, entrambe valide per lo screening di primo livello; inoltre l'alta produttività e l'accesso continuo del Sistema Immulite, ci ha permesso di: abbassare il TAT complessivo, razionalizzare la gestione campioni, migliorare l'intero processo operativo.

084

ESPOSIZIONE AL VIRUS DI EPSTEIN-BARR IN PAZIENTI DI ETÀ PEDIATRICA: STUDIO RETROSPETTIVO

Borelli A., Caruso V., Nistico' S., Leone R.A., Minchella P., Potente G.I., Folino C., Camerino M., Caruso D., Carlei M.I., Piccoli M., Cerminara M.T., Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, Azienda Sanitaria N. 6, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Introduzione. Il virus di Epstein-Barr, isolato nel 1964 da una coltura cellulare di tessuto con linfoma di Burkitt, è diffuso in tutto il mondo ed è l'agente eziologico della mononucleosi infettiva. L'infezione primaria viene acquisita in età infantile ed è spesso asintomatica, mentre con l'aumentare dell'età si manifesta in più del 50% dei casi con linfadenopatia, epatosplenomegalia, linfocitosi, faringodinia; oltre l'80% della popolazione mondiale sopra i 30 anni mostra evidenza sierologica di esposizione al virus, che permane per tutta la vita. Scopo del lavoro è valutare retrospettivamente la presenza degli anticorpi anti-Viral Capsid Antigen (anti-VCA) IgG ed IgM nei pazienti in età pediatrica ricoverati ed esterni afferenti alla nostra U.O. nell'anno 2005.

Materiali e Metodi. Sono stati esaminati n. 309 sieri di pazienti pediatrici con sospetto diagnostico di mononucleosi infettiva (n. 158 fascia d'età 2-6 aa; n. 72 fascia 7-11 aa; n. 79 fascia 12-16 aa). Test utilizzati con metodo in immunofluorescenza (Ditta Focus Diagnostics, distribuiti dalla Ditta Alifax): a) test EBV VCA IgM RIFA, utilizza come substrato cellule di mammifero (circa 5-10%) che esprimono un VCA ricombinante; b) test EBV VCA IFA IgG, utilizza un substrato costituito da linfociti infettati dal virus. Per la ricerca delle IgM i sieri, adsorbiti per la rimozione delle IgG, sono stati testati alla diluizione 1:20; per la ricerca delle IgG alla

diluizione 1:64 in soluzione tampone.

Risultati. Dei 309 sieri analizzati n. 127 (41,1 %) risultavano IgG positivi / IgM negativi; n. 31 (10,0 %) positivi sia per IgG che per IgM; n. 151 (48,9 %) negativi sia per IgG che per IgM, mentre nessuno era IgG negativo / IgM positivo. La distribuzione degli anticorpi per fasce di età è mostrata nella tabella.

Età/Tot	G+/M- (%)	G+/M+ (%)	G-/M- (%)	G-/M+ (%)
2-6 (158)	45 (28,5)	12 (7,6)	101 (63,9)	0
7-11 (72)	37 (51,4)	9 (12,5)	26 (36,1)	0
12-16 (79)	45 (57,0)	10 (12,7)	24 (30,4)	0
309	127	31	151	0

Conclusioni. Dai dati ottenuti risulta che nella fascia d'età 2-6 aa ben 63,9 % ancora non ha anticorpi anti-VCA IgG ed IgM, mentre nelle altre due fasce la percentuale è rispettivamente del 36,1 % e del 30,4 %. L'inserimento in comunità scolastica sembra favorire l'esposizione al virus.

085

EVALUATION OF A NEWLY DEVELOPED QUANTITATIVE TAQMAN HEPATITIS C VIRUS-RNA ANALYTE SPECIFIC REAGENT (ASR) ASSAY

Cannone M. C.; Pulvirenti F.R.²; Lucchi P.¹; Barberis M. C.¹;

¹Multimedica Multilab, Via Fantoli 16/15 20138 Milano, Italy,

²Abbott Molecular, Via Mar Della Cina 262, 20144 Roma, Italy,

Introduction. Limitations of current quantitative assays for HCV- RNA include insensitive lower limits of detection and lack of linearity in the upper range. Recently, a new ASR assay based on real-time RT-PCR developed by Celera Diagnostics (Alameda, CA, USA) and marketed in Europe by Abbott Molecular (Chicago, IL, USA), has become available.

Methods. We compared the Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) with the Celera-Abbott real time PCR, performed on the ABI PRISM 7000 SDS instrument on samples manually extracted by QIAamp viral RNA mini-kit.

Results. Passing-Bablock regression on 38 retrospective samples showed a correlation coefficient R² of 0.905, while the mean Celera- Monitor difference was - 0.87 log UI/mL. Accuracy, precision and linearity were verified with an Acrometrix panel (50; 500; 50,000; 500,000; 1,000,000 IU/mL), tested in reps of 2 for each level during 4 runs. The total CV (log IU/mL) ranged from 3.9% (1,000,000 IU/mL) to 8,0% (100 IU/mL). Linear regression line between Celera HCV-ASR measured log UI/mL (y) and expected log UI/mL (x) values had the equation: $y=0.996x - 0.366$ ($R^2=0.9969$), while the detection rate at 50 IU/mL was 100% (8/8).

Conclusions. The new Celera HCV-RNA ASR assay showed excellent sensitivity, good precision and linearity, and correlated well with the test of reference. Although both assays express results in International Units, they were not interchangeable as a bias was noted, more pronouncedly in patient samples than in the panel. The wider dynamic range coupled with the exquisite sensitivity of the Celera HCV RNA assay allows a relevant gain of reportable results, avoiding reflexing samples to a further dilution step or to a qualitative test.

086

CASE REPORT: COMPARSA DI HBV DOPPIO-MUTANTE RESISTENTE ALL'ADEFOVIR DOPO TERAPIA PROLUNGATA CON LAMIVUDINA

Visca M.¹, Longo R.¹, Cappiello G.¹, Romano S.¹, Bernassola M.¹, Gallinaro V.², De Sanctis G.M.², Spanò A.¹

¹U.O.C. Microbiologia Virologia e Immunologia, Ospedale S. Pertini - Roma

²Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali, Policlinico Umberto I - Roma

Introduzione. Il trattamento dell'epatite B cronica con adefovir (ADV) può migliorare sensibilmente il profilo virologico e biochimico nei pazienti resistenti alla lamivudina (LAM).

L'uso prolungato di ADV porta allo sviluppo di resistenza (18% dopo 4 anni).

Caso clinico. Maschio italiano; 56 anni; diagnosi di infezione da HBV (genotipo D) dal 1987 (HBsAg+; HBeAg+; HBeAb-; HBcAb+; HBsAb-); transaminasi basali persistentemente elevate; negativo per HDV-Ab, HCV-Ab e HIV-Ab. Dopo 3 cicli di terapia (1991-1996) con interferone ricombinante (IFN α 2a) a giugno 2000 si instaura una terapia con LAM (HBV-DNA=2x10⁶ copie/mL; epatite cronica attiva; indice di Knodell=3+1).

A marzo 2002 si documenta una resistenza genotipica a LAM (codone 204); la terapia viene sospesa per 7 mesi. Ad agosto 2003 si inizia il trattamento con ADV, interrotto a settembre 2004 per mancata risposta virologica e biochimica (HBV-DNA e ALT persistentemente elevate).

Alla sospensione si osserva un picco di ALT e a febbraio 2005 si instaura nuovamente la terapia con LAM avendo rilevato, a novembre 2004, la presenza di virus LAM-sensibile (rtM204, ma si individua la mutazione rtA181T).

Dopo 8 mesi si documenta la comparsa di mutazioni comuni associate a LAM-resistenza (rtL180M+rtM204V).

Si tenta nuovamente la terapia con ADV (dicembre 2005). Dopo solo 6 mesi si osservano 2 mutazioni associate ad ADV-resistenza (rtN236T+rtA181T).

Discussione. L'HBV ADV-resistente, con la sola mutazione rtN236T, conserva *in vivo* la suscettibilità a LAM rendendo possibile l'alternanza dei due trattamenti.

La mutazione rtA181T sembra legata a resistenza crociata ad ADV+LAM e può emergere durante un trattamento prolungato con LAM.

Un paziente con le mutazioni rtN236T+rtA181T non sembra quindi poter essere candidato alla terapia né con ADV né con LAM. Ratzu *et al.* (2006) descrivono un caso analogo con una risposta eccellente al tenofovir.

La possibilità di resistenza crociata rende fondamentale il monitoraggio frequente della suscettibilità farmacologica e la disponibilità di nuovi trattamenti antivirali.

087

CONFRONTO TRA DUE DOSAGGI IN REAL-TIME PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI HCV-RNA

¹Ciotti M., ¹Marcuccilli F., ¹Guenci T., ¹Perno C-F.

¹Laboratorio di Virologia molecolare, Policlinico Tor Vergata, Viale Oxford, 81 - 00133 Roma.

Introduzione. Abbiamo effettuato un confronto tra due dosaggi quantitativi di HCV-RNA basati su amplificazione del target in fase omogenea e utilizzo di sonde fluorescenti: Roche COBAS Ampliprep-COBAS TaqMan (CAP-CTM) e Abbott Real-Time HCV-RNA. Entrambi i dosaggi prevedono l'estrazione automatica dell'RNA virale per affinità con microparticelle magnetiche. I test hanno range dinamico paragonabile (Abbott: $12-1,0 \times 10^8$ UI/mL; Roche: $15-6,9 \times 10^7$ UI/mL). Mentre il test Roche si basa su tecnologia TaqMan, il test Abbott non dipende dall'attività esonucleasica della polimerasi, consentendo di introdurre un passaggio di ibridizzazione e lettura a temperatura inferiore. In teoria, verrebbe così neutralizzato l'effetto di eventuali "mismatches" presenti nella regione di ibridizzazione del probe, garantendo una quantificazione indipendente dal genotipo. **Metodi.** Sono stati analizzati con entrambi i test 112 campioni retrospettivi da pazienti con infezione da HCV. **Risultati.** Per i 102 campioni quantificabili con entrambi i metodi, l'equazione della retta di regressione lineare ($y=\text{Abbott}$, $x=\text{Roche}$) era $y=1,013x-0,778$, con coefficiente di correlazione $r=0,9718$. L'analisi di Bland-Altman mostrava una differenza media (Abbott-Roche) pari a $-0,70$ log UI/mL (mediana = $-0,72$ log; DS = $0,26$ log). 6 campioni erano negativi con entrambi i metodi; 2 campioni con risultato Roche <15 UI/mL e target rilevato, erano negativi con Abbott; un campione con risultato Roche <15 UI/mL e target rilevato, mostrava un valore di 612 UI/mL con il test Abbott.

Conclusioni. I due dosaggi hanno mostrato eccellente correlazione ed elevata concordanza qualitativa. La sensibilità dei test appare equivalente. Nonostante siano entrambi espressi in Unità Internazionali, i risultati dei due metodi non sembrano confrontabili. Le differenze potrebbero essere dovute o a fattori pre-analitici non meglio identificati o, come appare più probabile, a un differente processo di standardizzazione delle aziende produttrici.

088

VALUTAZIONE QUANTITATIVA DI HIV RNA CON IL SISTEMA NUCLESENS EASYQ HIV-I E CORRELAZIONE CON VERSANT HIV -I (bDNA)

Colao M.G., Capobianco T., Mazzarelli G., Parri F.

Laboratorio di Sieroinmunologia,
Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze

Introduzione. Il monitoraggio e la determinazione della carica virale in pazienti HIV positivi sono considerati importanti marcatori prognostici per seguire l'evoluzione clinica del paziente sieropositivo.

Nel presente studio, su campioni di routine, sono state valutate le performance del sistema NucliSens EasyQ HIV-1 (BioMérieux) che combina l'amplificazione NASBA con una rilevazione Real-Time con sonde molecular beacons, ed è stata eseguita una analisi di comparazione dei risultati ottenuti con il sistema Versant HIV-1 (Bayer) basato su un'amplificazione del segnale (bDNA).

Materiali e Metodi. Metodiche utilizzate:

- NucliSens EasyQ HIV-1 v.1.1 previa estrazione su easyMAG
- Versant HIV-1 RNA v.3.0.

174 campioni di plasma di pazienti con HIV/AIDS, in diversi regimi di trattamento HAART, sono stati analizzati con i due metodi allo scopo di valutarne la correlazione.

Per NucliSens EasyQ HIV-1 è stata valutata la riproducibilità intra-run, mediante saggi ripetuti 5 volte su 4 campioni, e la linearità su 4 campioni diluiti 1:10, 1:100, 1:1000.

Risultati. Sui 174 campioni confrontati, la concordanza è stata del 94,8%:

- 79 sono risultati positivi e 86 al di sotto della soglia di sensibilità con entrambe le metodiche
- 9 sono risultati discordanti: 5 positivi con bDNA e inferiori alla soglia con Real-Time; 4 inferiori alla soglia con bDNA e positivi con Real-Time.

Il coefficiente di correlazione R^2 , sui 79 campioni positivi, è risultato essere 0.84.

La valutazione della riproducibilità sui 4 campioni ha dato i seguenti valori di media e deviazione standard: $3,62 \pm 0,11$, $3,61 \pm 0,10$, $4,71 \pm 0,14$, $4,83 \pm 0,21$.

La linearità è stata dimostrata sui 4 campioni con buoni risultati.

Conclusioni. La metodica NucliSens EasyQ è risultata soddisfacente per la sovrapposibilità dei risultati con il sistema precedentemente utilizzato nel nostro Laboratorio (Versant bDNA). La combinazione di NucliSens con easyMAG permette di testare 48 campioni in quattro ore. Il vantaggio di una rivelazione Real-Time, con possibilità di valutare la carica virale su un ampio range dinamico, è associato ad un'alta produttività, una buona performance, nonché ad un facile utilizzo della strumentazione dotata di un software intuitivo.

089

ANTICORPI NON-ORGANO-SPECIFICI E INFEZIONE DA BKV IN UNA POPOLAZIONE DI TRAPIANTATI RENALI

¹Costa C., ¹Bergallo M., ²Touscoz G.A., ¹Sinesi F.,
¹Merlino C., ¹Re D., ³Giacchino F., ²Segoloni G. P., ¹Cavallo R.

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia,
Laboratorio di Virologia, Università di Torino;

²S.C.D.U. Epatogastroenterologia, Laboratorio di Fisiopatologia Epatica e Digestiva, Ospedale Molinette, Torino;

³, ⁴Dipartimento di Medicina Interna, Unità Trapianto Rene, Ospedale Molinette, Torino.

Introduzione. L'infezione latente da polyomavirus BK (BKV) può riattivarsi nei soggetti immunocompromessi o con lupus erythematosus sistemico (LES). Nei trapiantati renali BKV può causare nefropatia e rigetto. BKV è stato associato a manifestazioni autoimmuni, ipotizzando un possibile ruolo nella patogenesi del LES. Anticorpi anti-dsDNA sono stati rilevati in animali da esperimento inoculati con BKV. Si ipotizza che l'espressione *in vivo* dell'antigene T

large di BKV determini la produzione di anti-dsDNA secondo un meccanismo aptene-carrier. Scopo di questo studio è di indagare la correlazione tra BKV ed autoimmunità in trapiantati renali valutando la prevalenza di anticorpi non-organo-specifici (NOSA): anti-nucleo (ANA), anti-muscolo liscio (SMA), anti-mitocondrio (AMA) ed anti-microsomi epatici e renali (LKM) mediante immunofluorescenza indiretta (IIF).

Metodi. Campioni sierici di 95 trapiantati renali (64 M, 31 F; età media 54.07 anni, range 19-78), raccolti nel follow-up post-trapianto (media \pm SD, 8.5 ± 15.6 mesi; range 1-104), sono stati testati mediante IIF, diluiti 1:40, su sezioni criostatiche di fegato, rene e stomaco di ratto e su cellule HEP-2. L'infezione da BKV è stata valutata mediante BKV-DNA con PCR quantitativa-competitiva.

Risultati. NOSA erano presenti in 25 su 95 (26.3%) pazienti: 18 ANA e 6 SMA. Un paziente era positivo sia per ANA sia per SMA. Nessun paziente era positivo per AMA o LKM. Il pattern ANA era omogeneo in 13 pazienti, granulare in 3, nucleolare in 2. BKV era positivo in 16 su 95 (16.8%) pazienti (carica virale, media 228530 copie/ml; range 160-1600000): 3 NOSA-positivi e 13 negativi. BKV era negativo in 79 su 95 (83.2%) pazienti: 22 NOSA positivi e 57 negativi.

Conclusioni. La differenza di prevalenza di NOSA tra pazienti BKV positivi e negativi non era significativa. Non sembra esistere una correlazione tra BKV e NOSA nei trapiantati renali. Ulteriori studi su campioni pre- e post-trapianto ed una popolazione più ampia potrebbero chiarire meglio questi risultati.

090

NON-ORGAN-SPECIFIC AUTOANTIBODIES IN CMV PP65-ANTIGENAEMIA-POSITIVE AND -NEGATIVE RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

¹Costa C., ¹Bergallo M., ²Touscoz G.A., ¹Sidoti F., ¹Merlino C., ³Segoloni G.P., ⁴Giacchino F., ¹Cavallo R..

¹Department of Public Health and Microbiology, Virology Unit, University of Turin.

²S.C.D.U. Gastrohepatology, Laboratory of Digestive and Hepatic Pathophysiology, Molinette Hospital, Turin.

³Department of Internal Medicine, Renal Transplant Unit, Molinette Hospital, Turin.

⁴Nephrology Unit, Ivrea Hospital, Italy

Introduction. A relation between CMV and non-organ-specific antibodies (NOSA) has been reported, hypothesizing a role in the development of rejection in transplant recipients.

Objectives. to investigate presence of NOSA (antinuclear [ANA], anti-smooth muscle [SMA], anti-mitochondrial [AMA], anti-liver-kidney-microsomal [LKM] antibodies), relation to CMV infection and development of acute rejection in renal transplant recipients.

Methods. NOSAs were evaluated in 132 serum samples, from 59 patients (39 M, 20 F; mean age 53.5 years, range 19-78), collected at the time of transplant and during the follow-up post-transplantation (median 35 days, range 4-630) by indirect immunofluorescence on sections of rat liver, kidney and stomach, and on HEP-2 cell lines. CMV infection was evaluated by pp65-antigenaemia.

Results. NOSAs were positive in 26 of 132 (19.7%) samples obtained from 15 patients: ANA, SMA and LKM were pre-

sent, respectively, in 21, 5 and 1 case (one sample positive for both ANA and SMA): 17 antigenaemia-negative and 9 antigenaemia-positive ($p = n.s.$). None was positive for AMA. Pp-65 antigenaemia was positive in 36 samples (27.2%; number of pp-65-positive cells/200.000 PMN: 1-50 in 27, >50 in 9): 9 NOSA-positive and 27 NOSA-negative ($p = n.s.$). Acute rejection developed in 8 patients: 3/36 pp65-positive cases vs 5/96 pp65-negative cases ($p = n.s.$) and in 4/26 NOSA-positive cases vs 4/102 NOSA-negative cases ($p = 0.07$, $n.s.$).

Conclusions. It doesn't seem to exist a relation between CMV infection, NOSAs and acute rejection in renal transplant recipients. Nevertheless, the development of acute rejection tended to be more frequent in NOSA-positive patients.

091

DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI DI HBV NELL'AREA NOVARESE

Crobu M.G., Ravanini P., Nicosia A.M., Grossini E., Cagliano M., Fonio P., Fortina G.

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

Introduzioni. Si conoscono almeno 8 genotipi principali di HBV, classificati con le lettere da A a H. La distribuzione geografica di questi genotipi è molto caratteristica. Nelle regioni mediterranee prevale nettamente il genotipo D.

Studi recenti hanno indicato come il genotipo virale influisca grandemente sul decorso della malattia epatica: il genotipo A è associato a lenta progressione, mentre i genotipi C e G sono associati a maggiore rapidità di evoluzione verso la cirrosi. Il genotipo D è associato a maggiore gravità della patologia epatica, se comparato con i genotipi A e C, e ancor più se comparato con il genotipo B.

Altri studi hanno invece associato il genotipo con la risposta ai trattamenti antivirali. Da queste indicazioni emerge una migliore risposta dei genotipi A e B all'Interferone, se confrontati con i genotipi C e D, che invece presentano una scarsa risposta a questo tipo di trattamento.

La conoscenza del genotipo virale potrebbe quindi essere utile clinicamente per poter decidere correttamente quale tipo di trattamento intraprendere, sempre in considerazione degli altri parametri clinici.

Metodi. In questo studio abbiamo voluto valutare la distribuzione dei genotipi di HBV nell'area afferente all'ospedale di Novara, allo scopo di verificare se il genotipo D sia l'unico presente o se vi sia una consistente presenza anche di altri genotipi virali.

Risultati. Tra i 120 casi di pazienti HBV cronici, abbiamo riscontrato 98 genotipi D (pari all'81%), e 22 genotipi non-D (pari al 19%). Tra questi ultimi il genotipo prevalente è risultato il genotipo A (18 casi - 15% del totale), seguito dal genotipo E (3 casi), e dal genotipo C (1 caso).

Questi risultati indicano come nella nostra regione vi sia una elevata prevalenza di genotipo D, come previsto, ma anche una consistente presenza di genotipo A, considerato più sensibile all'Interferone. La ricerca del genotipo virale di HBV potrebbe quindi essere utile al clinico per la corretta scelta terapeutica, anche nelle nostre regioni geografiche.

092

CONFRONTO TRA SISTEMI AUTOMATICI NELLA DETERMINAZIONI SIEROLOGICHE DI HBV, HCV E HIV

De Rango C., Gianello R., Dusi D., Molinari C., Faccoli R.

Servizio di Medicina di Laboratorio,
Fondazione Poliambulanza Istituto Ospedaliero, Brescia.

Introduzione e scopo del lavoro. Abbiamo inteso confrontare le prestazioni analitiche di due sistemi automatizzati con lettura in chemiluminescenza (Architect, Abbott Diagnostics e Vitros Eci, Ortho Clinical Diagnostics) per le analisi dei marcatori sierologici di infezione da virus HBV, HCV e HIV. **Metodi.** Campioni di "routine" (n= 24) sono stati analizzati in parallelo con i due sistemi. I campioni reattivi per HBsAg, anti-HCV o anti-HIV sono stati analizzati con test di secondo livello. **Risultati.**

- A) HBsAg: su 224 campioni la concordanza era 99,1%, con una migliore specificità Architect (100% vs. 99,45%). Abbiamo analizzato la correlazione tra il segnale Architect e quello Vitros su 21 campioni positivi, trovando una relazione lineare ($r=0,976$).
- B) Anti-HCV: 224 campioni, concordanza 95,1%, 11 discrepanze di cui 10 reattivi Vitros e negativi Architect (6 negativi e 4 indeterminati al RIBA), per una specificità del 98,7% con Architect e del 91,8% con Vitros.
- C) Anti-HIV: 106 campioni, concordanza 95,3%; i 5 discrepanze (tutti reattivi Vitros e negativi Architect) erano falsi positivi: sui 4 positivi sia con Architect che con Vitros, due erano positivi per antigene p24 con il test Vidas p24 Duo.
- D) anti-HBs: su 41 campioni clinici la concordanza era quasi assoluta: l'unico discordante era debolmente positivo con Architect (15,6 mUI/mL) e negativo con Vitros (5 mUI/mL). La correlazione tra i due test su 26 campioni era buona ($r=0,906$), con i valori Architect più elevati.
- E) Altri marcatori HBV: concordanza quasi assoluta su 28 determinazioni tra HBeAg, anti-HBe e anti-HBc.

Conclusioni. I test sierologici sul sistema Architect appaiono più specifici dei corrispondenti test sul sistema Vitros, con delle importanti implicazioni gestionali e di spesa. Inoltre, la possibilità della determinazione simultanea di antigene p24 e anticorpi anti-HIV, garantita dal test Architect HIV Ag/Ab Combo, è di concreta utilità nella diagnosi precoce dell'infezione da HIV.

093

CONFRONTO TRA DATABASE ONLINE PER LA SOTTOTIPIZZAZIONE DI SEQUENZE HVI-1

Di Nicuolo G.¹, Battisti S.¹, La Porta R.¹, Starace M.¹, Gargiulo M.², Viglietti R.²¹Servizio di Virologia,²3^a Divisione Malattie Infettive, A. O. "D. Cotugno", Napoli

Introduzione. Le sequenze del gene *pol* di HIV-1 ottenute con il test di farmaco-resistenza sono anche usate per la sottotipizzazione. Scopo di questo lavoro è stato confrontare tre database online comunemente usati per la definizione del sot-

totipo e delle forme circolanti ricombinanti (CRFs) di HIV-1. **Materiali e metodi.** Sono state incluse nello studio le sequenze del gene *pol* di HIV-1 di 442 soggetti arruolati per il test di farmaco-resistenza. Il sequenziamento è stato effettuato con kit ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostics, USA) su ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem, USA). Le sequenze sono state sottoposte ad interpretazione per la definizione del sottotipo ai database Stanford://hivdb.stanford.edu/, NCBI://ncbi.nih.gov/REGA://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/ **Risultati.** Di 442 sequenze: 397=B (89,9%), 45 non-B (10,2%), i tre sistemi analitici hanno fornito risultati concordanti per 378 (85,5%): B=355 (89,4%), non-B=23 (37,8%). Una significativa discordanza ($p<0,001$) è stata osservata nella definizione dei sottotipi non-B. Stanford ha assegnato il sottotipo non-B in tutti i casi: 35 sottotipi o CRFs definiti e 10 misti (sottotipo o CRF differente per RT e PR); REGA solo in 37 casi come sottotipo o CRF definito (8 non assegnati); NCBI in 28 casi come sottotipo o CRF definito e in 17 misto (2 o più sottotipi/CRFs). I 23 risultati concordanti dei tre sistemi analitici per sottotipo non-B erano: CRF02_AG=16, A=3, C=2, D=1, G=1. Stanford e REGA hanno dato risultati concordanti in n=31 (68,9%) casi, Stanford ed NCBI in n=23 (51,1%), REGA ed NCBI in n=27 (60,0%). Dei 22 risultati discordanti Stanford ne ha assegnati 12 come sottotipi o CRFs definiti e 10 misti, REGA 14 come sottotipi definiti e 8 (17,8%) non assegnati, NCBI 4 definiti e 18 misti. **Conclusioni.** Nell'85% dei casi c'è una buona concordanza tra i tre approcci analitici. La concordanza è soddisfacente per il sottotipo B (89,4%), mentre per i non-B si osserva una discordanza statisticamente significativa. L'applicazione alla pratica clinica di questi sistemi per la sottotipizzazione di HIV-1 deve essere considerata con prudenza.

094

SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICO-MOLECOLARE DEI VIRUS RESPIRATORI IN UNA COORTE DI SOGGETTI PEDIATRICI (2004)

Perin S.¹, Tanzi E.², Ruzza ML.³, Amendola A.², Colzani D.², Podestà AF.³, Farina C.¹¹UO Microbiologia,²UO Pediatria - AO 'Ospedale San Carlo Borromeo' - Milano e³Dipartimento di Sanità Pubblica - Microbiologia

- Virologia dell'Università degli Studi di Milano, Milano

Introduzione. La sorveglianza epidemiologico-molecolare dei virus respiratori nelle popolazioni a maggior incidenza di infezioni respiratorie acute (ARI), quale quella pediatrica, è un elemento essenziale per predisporre strategie diagnostiche, terapeutiche e preventive sempre più mirate. Inoltre consente di correlare la manifestazione clinica all'assetto genetico dei virus coinvolti.

Materiali e metodi. Nel periodo marzo-maggio 2004 sono stati arruolati 108 soggetti di età pediatrica (59M, 49F; età media: 32,1 mesi) con sintomatologia correlabile ad ARI. Ad ognuno di essi è stato effettuato un tampone oro-faringeo (TF) successivamente analizzato mediante l'applicazione di un pannello di saggi molecolari per la diagnosi virologica:

- 1) *multiplex*-PCR per la determinazione simultanea dei virus Influenzali A e B e dell'RSV;

- 2) *multiplex*-PCR per i Coronavirus 229E e OC43;
- 3) *multiplex*-PCR per i virus Parainfluenzali 1-4 (H1PV 1-4);
- 4) *emi-nested*-PCR per la determinazione delle sequenze geniche dei Rhinovirus;
- 5) *nested*-PCR per la ricerca di sequenze geniche dei Metapneumovirus umani (HPMV).

Risultati. La diagnosi virologico-molecolare ha evidenziato, nel 49.1% (53/108) dei campioni biologici analizzati la presenza di acido nucleico di uno o più degli agenti virali indagati. In particolare, i Coronavirus (33.3%) e i Rhinovirus (30%) erano i virus principalmente identificati ($p < 0.05$), seguiti da HMPV (9.4%), RSV (7.5%), Influenza A e H1PV-3 (5.7%), Influenza B (3.8%); nel 13.2% sono state evidenziate co-infezioni virali.

Il 51.4% delle infezioni delle *alte vie respiratorie* ed il 41.7% delle infezioni delle *basse vie respiratorie* era associata ad una eziologia di tipo virale, con Rhinovirus e Coronavirus come agenti eziologici principalmente coinvolti nelle prime, mentre Coronavirus (40%) e virus influenzali (26.6%) nelle seconde.

Conclusioni. I risultati ottenuti confermano la rilevanza dei virus come agenti eziologici delle ARI in età pediatrica, anche nel periodo primaverile. La caratterizzazione virologico-molecolare ha permesso sia di valutare la distribuzione epidemiologica stagionale dei virus associati alle ARI, sia di correlare patogeni e manifestazioni cliniche nei soggetti in età pediatrica.

095

SORVEGLIANZA DELL'INFLUENZA IN ETÀ PEDIATRICA (2004-2005)

Amendola A.,¹ Perin S.,² Ruzza ML.,³ Farina C.,² Pariani E.,
Podestà AF.,³ Zappa A.,¹ Tanzi E.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica - Microbiologia
- Virologia dell'Università degli Studi di Milano, Milano
²UO Microbiologia, ³UO Pediatria
- AO 'Ospedale San Carlo Borromeo' - Milano

Introduzione. Le ARI (*Acute Respiratory tract Infection*) sono patologie sostenute da diversi agenti eziologici in grado di causare un quadro clinico con sintomatologia a carico dell'apparato respiratorio. Gli agenti eziologici spesso associati ad infezioni delle basse vie aeree, sono i virus influenzali.

Materiali e metodi: Durante la stagione influenzale 2004-2005 sono stati arruolati 100 pazienti (51 maschi e 49 femmine, età media: 19 mesi) con sintomatologia correlabile ad infezione respiratoria acuta afferenti ai servizi di Pronto Soccorso e Pediatria dell'A.O. San Carlo Borromeo di Milano. Ad ognuno di essi è stato effettuato un prelievo (aspirato naso-faringeo), sottoposto a diagnosi virologica mediante: 1) *multiplex nested* PCR per la simultanea rilevazione di frammenti genici codificanti per la proteina di matrice dei virus influenzali A e B; 2) *multiplex nested* PCR per l'amplificazione di frammenti genici dell'emoagglutinina dei virus influenzali di tipo A (H1 e H3); 3) analisi di sequenza del gene HA del virus influenzale di tipo A.

Risultati. La ricerca di sequenze geniche dei virus influenzali A e B ha permesso di rilevare nel 12% (12/100) dei soggetti una infezione da virus influenzale A, e nel 4% (4/100) da virus influenzale di tipo B. La sottotipizzazione dei campioni infetti con virus influenzale A, ha evidenziato 4/12 (33.3%) campioni positivi per H1 e 8/12 (66.7%) positivi per H3. Il sequenziamento genomico di campioni A/H3N2 positivi ha mostrato una elevata omologia (99%) con i ceppi virali isolati

nella stagione 2004-2005 e con il ceppo vaccinale (California-like) utilizzato in tale stagione influenzale.

Conclusioni. La diagnosi molecolare di infezione virale ha consentito di effettuare una sorveglianza virologica in tempo reale dei patogeni maggiormente correlati ad infezioni respiratorie in età pediatrica. Inoltre, l'identificazione dei match antigenici tra ceppi vaccinali ed epidemici contribuisce all'approfondimento delle dinamiche di evoluzione e di diffusione dei virus influenzali.

096

ENTERITI DA ASTROVIRUS E NOROVIRUS IN ETÀ PEDIATRICA: UN ANNO DI SORVEGLIANZA

Farina C.,¹ Gibelli M.,² Marini F.,¹ Pellizzari ML.,¹
Podestà AF.,² Scalfaro C.²

¹UO Microbiologia,
²UO Pediatria - AO 'Ospedale San Carlo Borromeo' - Milano

Introduzione. Sebbene l'eziologia virale delle enteriti sia stata prospettata già 50 anni fa, esse costituiscono ancora oggi una patologia largamente sottostimata.

Accanto a virus il cui ruolo eziologico è stato da tempo dimostrato (Enterovirus, Adenovirus 40 e 41 e Rotavirus) soprattutto in soggetti di età pediatrica od in pazienti immunocompromessi, esistono attualmente evidenze clinico-epidemiologiche relative al coinvolgimento di altri virus, quali i Calicivirus (Norwalk-like e Sapporo-like virus), e gli Astrovirus, in episodi sporadici e/o epidemici di gastroenterite.

Materiali e metodi. I campioni fecali di 292 bimbi ricoverati presso l'UO Pediatria dell'AO 'Ospedale San Carlo Borromeo' dal marzo 2005 a febbraio 2006 sono stati esaminati per la ricerca di *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., Rotavirus, Astrovirus e Norovirus 1 e 2. Per la ricerca di Astrovirus e di Norovirus sono stati utilizzati immunodosaggi enzimatici in fase solida: IDEIA Norovirus (Dako Cytomation Ltd, Ely, UK) ed il dosaggio immunoenzimatico amplificato qualitativo Amplified IDEIA Astrovirus (Dako Cytomation).

I test utilizzano un'associazione di anticorpi mono- e policlonali genere-specifici per i Norovirus di genogruppo 1 e 2 e per Astrovirus per i quali, inoltre, è prevista l'amplificazione della marcatura.

Risultati. Sono stati complessivamente identificati 9 casi (3.1%) di infezione da Astrovirus, 4 (1.4%) da Norovirus 1 e 6 (2.1%) da Norovirus 2. I risultati sono compendati in tabella, che riporta l'andamento stagionale dei casi osservati.

Mese	Astrovirus	Norovirus 1	Norovirus 2
Marzo	-	1	1
Aprile	1	3	-
Maggio	4	-	1
Settembre	1	-	-
Dicembre	2	-	-
Gennaio	-	-	2
Febbraio	1	-	4

Conclusioni. I dati del nostro Centro, per quanto ancora preliminari, sono significativi per quanto attiene alle forme sporadiche di enterite da Noro- e Astrovirus, mostrando come la circolazione di questi virus, prevalentemente inverno-primaverile (15/23 casi tra dicembre e marzo), non sia circoscritta esclusivamente ad episodi epidemici, ma possa essere descritta routinariamente nella pratica clinica.

097

IMPORTANZA DEL TEST HPV NEL TRIAGE DELLE ANOMALIE SQUMOSE DI INCERTO SIGNIFICATO (ASCUS)

Forese F., Venturi C., Parrillo M.G., 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 e obiettivo. Studi recenti mettono in evidenza che il test HPV è utile nel triage delle anomalie squamose di incerto significato (ASCUS) in quanto presenta un'alta sensibilità per la rilevazione delle lesioni di alto grado (HSIL) con diminuzione degli esami di colposcopia e delle visite di follow-up.

Scopo di questo studio è quello di valutare se, anche nella nostra casistica di pazienti che presentano ASCUS all'esame citologico, il test HPV ha una sensibilità alta nel rilevare lesioni di alto grado.

Metodologia. In una casistica di 249 donne di età compresa fra i 15 e gli 81 anni con referto citologico di ASCUS al pap-test è stata effettuata la ricerca e genotipizzazione dell'HPV con metodica PCR ed impiego degli enzimi di restrizione (ditta Diatech) su prelievo endocervicale eseguito con citologia su strato sottile (Thin-Prep, Cytec). Nei casi discordanti fra positività all'HPV e istologia il test è stato eseguito su DNA estratto da biopsia.

Risultati. L'infezione da HPV è stata riscontrata nel 31% (77/249) dei casi ASCUS e il 77% (59/77) presentavano HPV ad alto rischio (AR-HPV). All'esame colposcopico i 59 casi con AR-HPV presentavano: 6 metaplasia squamosa, 17 displasia lieve, 7 displasia moderata, 5 displasia grave e 24 risultavano negativi alla colposcopia. I casi con HPV a basso rischio (LR-HPV) non presentavano nessun caso di displasia moderata o grave e 11 erano i casi negativi alla colposcopia. I 172 pazienti HPV negativi all'esame istologico presentavano 4 displasie moderate e nessun caso di displasia grave. I casi negativi alla colposcopia erano il 79% (110/139).

Conclusioni. I risultati riportati indicano un'alta sensibilità del test HPV e il suo inserimento nella gestione degli ASCUS risulta appropriata. Rimane aperta la problematica se tale test possa essere impiegato come alternativo all'attuale politica di ripetere la citologia dopo 6 mesi per le donne con ASCUS.

098

VALUTAZIONE QUANTITATIVA DI MARCATORI SIEROLOGICI E HBV-DNA IN PAZIENTI CON EPATITE CRONICA B

Stornaiuolo G.¹, Galli C.², Stanzione M.¹, Amato A.¹, Brancaccio G.¹, Chiodo F.³, Campisi D.³, Grassi L.³, Cò D.³, Masola M.³, Gesu G.³, Gaeta G.F.¹

¹Malattie Infettive, II Università, Napoli;

²Abbott Diagnostic, Roma;

³Microbiologia, Azienda Ospedaliera Niguarda, Milano

Introduzione e scopo del lavoro. Abbiamo valutato le dina-

miche di parametri sierologici quantitativi (HBsAg, IgM anti-HBc) e dell'HBV-DNA in pazienti con epatite cronica B trattati con Adefovir dipivoxil (ADV), in associazione o meno con Lamivudina (LAM), dopo insorgenza di resistenza alla Lamivudina.

Pazienti e metodi. Sono stati valutati 27 pazienti (22 maschi, 5 femmine; età media: 53±9 anni) con epatite cronica B HBeAg-negativa e con follow-up medio di 20 mesi (range: 11-26). Campioni di siero basali e ottenuti ogni 2-3 mesi sono stati analizzati per HBsAg (UI/mL) e IgM anti-HBc (S/CO) con i rispettivi metodi automatizzati Abbott Architect e per HBV-DNA (UI/mL) con metodica di amplificazione in "real time" (Artus).

Risultati. In base ai livelli di viremia durante il follow-up, 22 pazienti erano responders (R; HBV-DNA <200 UI/mL) e 5 non responders (NR). La maggior percentuale di mancata risposta era presente nei pazienti trattati con solo ADV (67% vs. 5% nei soggetti trattati con ADV+LAM). I livelli basali di ALT e IgM anti-HBc erano più elevati nei R, mentre sia l'HBV-DNA che l'HbsAg erano più elevati nei NR (HBsAg; mediana di 24.392 UI/mL vs. 3.903 UI/mL nei R; p<0.01). Vi era una moderata associazione tra livelli di HBV-DNA e di HBsAg. Nel corso del follow-up l'HBV-DNA calava rapidamente e in maniera assai significativa nei responders (mediana di 98 UI/mL a 6 mesi e di 8 UI/mL a 12 mesi), mentre l'HbsAg mostrava un calo evidente solo nei responders e dopo >18 mesi (mediana: 771 UI/mL).

Conclusioni. I marcatori sierologici di HBV forniscono indicazioni complementari alla viremia ed alla determinazione delle ALT nel monitoraggio dei pazienti con epatite cronica B. Le cinetiche di HBsAg e HBV-DNA appaiono differenti, forse a causa dell'ipotizzata relazione tra HBsAg in circolo e cccDNA epatocitario.

099

ACCURATEZZA DI DIFFERENTI SOGLIE PER L'INDICE DI AVIDITA' ANTI-HIV

Galli C.¹, Bossi V.², Regine V.³, Rodella A.⁴, Manca N.⁴, Camoni L.⁴, Suligoi B.³

¹Abbott Diagnostici, Roma;

²Laboratorio Analisi, Osp. Amedeo di Savoia, Torino;

³Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma;

⁴Dipartimento di Microbiologia e Virologia, Università di Brescia

Introduzione e scopo del lavoro. L'indice di avidità (AI) degli anticorpi anti-HIV aumenta progressivamente come variabile continua dalla sieroconversione e raggiunge un "plateau" entro il primo anno dalla positività. In questo studio abbiamo analizzato l'accuratezza di differenti valori soglia dell'AI per l'identificazione delle infezioni recenti da HIV.

Metodi. Abbiamo studiato 357 campioni di siero positivi per anti-HIV (EIA+Western blot) ottenuti da 127 soggetti infetti. La data di sieroconversione è stata stimata come il punto di mezzo tra le date dell'ultimo test anti-HIV negativo e del primo positivo. I campioni di siero sono stati analizzati per l'avidità anti-HIV (due aliquote diluite 1:10 rispettivamente in guanidina cloridrato 1M o in tampone) con il test AxSYM 1/2gO (Abbott). I campioni raccolti ≤6 mesi dopo la sieroconversione sono stati considerati infezioni recenti. Abbiamo calcolato la sensibilità e specificità mediante curve ROC per

i 4 cutoff di AI considerati (0,75; 0,80; 0,85 e 0,90).

Risultati. La prevalenza vera di infezioni recenti era 44,3% (158 campioni). Abbiamo classificato i campioni con un valore di AI \leq cutoff come infezioni recenti. I risultati ottenuti con i differenti valori soglia sono indicati in tabella:

AI Cutoff	Sensibilità	Specificità	Area sotto la curva ROC
0,75	89,2%	99,5%	94,4
0,80	93,0%	98,5%	95,8
0,85	95,0%	95,5%	95,2
0,90	96,2%	92,0%	94,1

Conclusioni. L'AI ha mostrato una buona sensibilità e specificità ai diversi cutoff. La migliore sensibilità si aveva ad una soglia di 0,90 e la migliore specificità ad una soglia di 0,75, ma la maggiore area sotto la curva ROC è stata osservata alla soglia di 0,80. Il vantaggio dell'AI è che, a seconda dell'obiettivo, possono essere impiegate soglie diverse in modo da privilegiare la sensibilità o la specificità del test. Per scopi epidemiologici, una soglia posta a 0,80 garantisce i risultati più accurati per l'identificazione delle infezioni recenti da HIV.

100

PRESENZA DI PAPILLOMAVIRUS AD ALTO RISCHIO ONCOGENICO IN UNA METASTASI DI UN CARCINOMA DELLA LARINGE

Giannattasio A.¹, Fierro P.², Panetti G.², Smeraglia R.³, Cusi M.G.⁴, Galano G.¹, Coppola C.¹

¹Servizio Virologia Ospedale P O Ascalesi,

²Otorinolaringoiatria Ospedale P O Ascalesi Napoli,

³Microbiologia e Virologia A. O. Monaldi Napoli,

⁴Università degli studi di Siena.

Introduzione. Il termine "cancro della testa e del collo" è stato di recente utilizzato in letteratura per definire le lesioni di alcuni siti anatomici: labbra, cavità orale, il naso ed i seni paranasali, naso-faringe, oro-faringe, ipo-faringe, laringe. Gli HPV ano-genitali sono fortemente associati al cancro della cervice uterina. Dati recenti di letteratura dimostrano la presenza di HPV ano-genitali anche nel "cancro della testa e del collo", soprattutto dei genotipi HPV 16 e 18. Alcuni studi recenti hanno dimostrato che HPV potrebbe essere etiologicamente importante soprattutto in certi tipi di cancro dell'oro-faringe, suggerendo una possibile trasmissione sessuale di HPV. Il nostro gruppo ha dimostrato la presenza di HPV 18 e 45 in in una metastasi di un carcinoma glottico-sovraglottico della laringe.

Metodi. Il DNA del campione esaminato è stato estratto da tre vetrini biotipici del tessuto metastatico. Successivamente, è stato amplificato con la metodica della NanoGen Advanced Diagnostics S.r.l., rivelato sul gel di agarosio e sottoposto a genotipizzazione con ibridazione inversa su piastra.

Risultati. l'amplificazione mediante PCR del DNA contenuto nel campione ha dimostrato la presenza di HPV. La successiva genotipizzazione del DNA virale ha rivelato la presenza di due genotipi ad alto rischio: il 18 ed il 45. Per confermare il risultato ottenuto il Dna virale verrà sottoposto a sequenziamento genico.

Conclusioni. HPV è un virus oncogeno al momento collega-

to soprattutto al cancro della cervice uterina e/o della cute. Recenti dati di letteratura però stanno sempre più evidenziando come questo virus e, in particolar modo alcuni genotipi ad alto rischio oncogenico, possa giocare un ruolo chiave in altri tipi di cancro (cancro della testa e del collo e alcuni cancri del polmone) e il risultato da noi ottenuto ne è la conferma.

101

VALUTAZIONE DEI TEST ANTI-TOXOPLASMA E ANTI-ROSOLIA DEL NUOVO STRUMENTO AUTOMATICO VIDIA

Giraldi C., Greco F., Lo Bianco A.M., Noto A., Orrico F., Perugini D., Savino O., Senatore C., Spadafora M., Tenuta R.

Virologia, Ospedale Annunziata, AO Cosenza

Introduzione. Il sistema VIDIA (bioMérieux) è un nuovo strumento completamente automatico concepito per semplificare la routine, implementare il livello di rintracciabilità e sicurezza dei dati, mantenendo al contempo alti livelli di performance qualitative.

In questo studio abbiamo valutato le performance dei test VIDIA per gli anticorpi anti-Toxoplasma ed anti-Rosolia confrontandole con il metodo LIAISON (DiaSorin) attualmente in uso nel nostro laboratorio.

Metodi. Sono stati analizzati complessivamente circa 150 campioni di routine, appartenenti ad una popolazione mista, sui quali sono stati effettuati i test VIDIA TOXO IgG, VIDIA TOXO IgM, VIDIA RUB IgG e VIDIA RUB IgM (bioMérieux) confrontandone i risultati con quelli ottenuti con i metodi LIAISON (DiaSorin). Per le discordanze sono stati previsti ulteriori approfondimenti ripetendo il test con un terzo metodo presente in laboratorio (kit ELISA in micro-piastra - Biot) unitamente all'analisi dello stato clinico del paziente.

Infine è stata analizzata la ripetibilità intra-serie e la riproducibilità inter-serie del test VIDIA TOXO IgG e VIDIA RUB IgG (secondo suggerimenti dell'NCCLS), utilizzando 2 pool di sieri a 4 diverse concentrazioni.

Risultati. Globalmente si è riscontrata una prevalenza di sieropositività per IgG ed IgM pari a circa il 21% per Toxo IgG, 10% per Toxo IgM, 88% per Rosolia IgG e 6% per Rosolia IgM.

La concordanza tra i metodi a confronto è stata del 97% per il Toxo IgG, 94% per Toxo IgM, 99% per Rosolia IgG e 94% per Rosolia IgM.

Sui risultati discordanti sono in corso ulteriori approfondimenti diagnostici per stabilire l'esatto stato immunologico dei pazienti.

La precisione intra-serie e la ripetibilità inter-serie (CV%) dei test VIDIA TOXO IgG e VIDIA RUB IgG erano comprese tra 1,5 e 7,7% circa.

Conclusioni. Dai risultati emerge globalmente un buon livello di concordanza tra il sistema VIDIA ed il metodo attualmente in uso (LIAISON); inoltre si rileva un elevatissimo grado di precisione intra-serie ed inter-serie dei test VIDIA, oltre che un certo livello di innovatività dello strumento circa la semplicità d'uso e la sicurezza dei dati prodotti.

102

PATTERN BIOCHIMICI, SIEROIMMUNOLOGICI E VIROLOGICI IN 15 SOGGETTI HDV POSITIVI

Greco F., Noto A., Palermo M., Perugini D., Savino O., Tenuta R., Giraldo C.

Virologia, Ospedale Annunziata, AO Cosenza

Introduzione. Da una indagine sieroepidemiologica, effettuata nel nostro laboratorio, circa la prevalenza del virus delta in Calabria, abbiamo rilevato 15 pazienti affetti da coinfezione HBV-HDV. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di definire i pattern biochimici, sierologici e virologici di questi pazienti, la coesistenza di infezioni da HCV e HIV e il valore clinico della presenza delle IgM anti-HDV.

Materiali e Metodi. Su 215 campioni, provenienti dalla nostra banca dati e riferiti esclusivamente al periodo gennaio-dicembre 2005, tutti appartenenti ad una popolazione HBsAg positiva, è stata determinata la presenza di IgG e IgM anti HDV (Sorin); sui campioni positivi per IgG anti-HDV sono state eseguite le seguenti determinazioni AST, ALT, HBeAb/Ag, HBcAb IgM (Abbott), HDVAg (Sorin), HBVDNA quantitativo (Real Time ROCHE e bDNA Bayer).

Risultati. Su 215 campioni HBsAg positivi, 15 pazienti mostravano la presenza di IgG anti-HDV (prevalenza HDV : 7%). Questi pazienti presentavano nel tempo (almeno due prelievi eseguiti nell'anno 2005) i seguenti pattern biochimici e sierovirologici per HBV: n.15 (100%) HBcAb IgM negativi, n.15 HBVDNA negativo o inferiore a 20.000 cp/ml (100%), n.10 con ALT alterate (68%). Il 90% di questi pazienti risultava avere una epatite anti HBeAb positiva ed inoltre tutti i pazienti mostravano una negatività per HDV Ag.

In 10 pazienti si riscontrava la presenza di IgM anti-HDV persistente nel tempo (un anno) che correlava con un'alterazione delle ALT ed assenza di viremia HBV. In 5 pazienti si rilevava una coinfezione con HCV ed in un solo paziente una coinfezione con HCV e HIV.

Conclusioni. Nel 2006 nonostante la vaccinazione obbligatoria nei confronti di HBV, la prevalenza nella nostra regione dell'infezione da HBV risulta essere ancora alta con circolazione del virus delta soprattutto nelle popolazioni a rischio. Nei pazienti HBsAg positivi/HBVDNA negativi, la positività degli anticorpi anti HDV IgM e l'incremento delle ALT sono indicatori predittivi di viremia da epatite delta.

- i) SMA-V, che reagiscono con la parete dei vasi renali
- ii) SMA-G, che reagiscono con la parete dei vasi e dei glomeruli renali
- iii) SMA-T che, oltre ai precedenti tipi reagiscono con la membrana basale dei tubuli renali. Gli SMA-V sono soprattutto immunoglobuline di tipo IgM mentre gli SMA-G/T sono di tipo IgG. Gli ASMA sono indici di epatite autoimmune ma si possono trovare anche in malattie del connettivo, neoplasie ed infezioni microbiche-virali.

Lo scopo dello studio è determinare la frequenza degli ASMA in pazienti affetti da CMV.

Materiale. Abbiamo esaminato

- 1) il siero di 100 pazienti con CMV positivo, 60 femmine - 40 maschi di età compresa tra 20-50 anni (età media di 36 anni)
- 2) il siero di 100 volontari di sangue dello stesso sesso ed età dei pazienti esaminati come gruppo di controllo.

Metodo. È stato utilizzato il metodo della immunofluorescenza indiretta substrato di rene di ratto (BIORAD USA, MBL JAPAN), con iniziale titolo 1: 40 e successiva diluizione dei sieri positivi fino alla loro negativizzazione.

Risultati. Sono risultati positivi 80 sieri (percentuale 80%), a medio titolo 1:80 (limite 1:40 -1:160) tutti di tipo SMA-V. Questi pazienti clinicolaboristicamente non presentavano malattie autoimmuni, neoplasie ed altre infezioni microbiche-virali. Del gruppo di controllo due sono risultati positivi a titolo 1: 40 e di tipo SMA-V (pearson's χ^2 $p < 10^{-17}$).

Conclusione. La positività degli ASMA (80%) a titolo basso, dipende da citomegalovirus, dopo l'esclusione di altre cause che ne giustificano la presenza.

104

L'AUMENTO DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELL'IFN-GAMMA È ASSOCIATO ALLA COINFEZIONE CON GBV-C IN PAZIENTI HIV INFETTI

Lalle E.¹, Abbate I.¹, Martini F.², D'Offizi G.³, Antonucci G.³, Castillett C.¹, Dianzani F.¹, Capobianchi MR.¹

¹Laboratory of Virology,

²Laboratory of Immunology;

³Clinical Department, National Institute for Infectious Diseases, INMI "L. Spallanzani", Rome, Italy.

Spallanzani; Via Portuense 292, 00149 Roma

³IV divisione, INMI L. Spallanzani, Via Portuense 292, 00149 Roma

Introduzione. È noto che la coinfezione con il GBV-C in pazienti HIV positivi determina un effetto protettivo sulla progressione dell'infezione di HIV. L'attivazione del sistema IFN potrebbe essere un possibile meccanismo coinvolto in questo fenomeno. Lo scopo del nostro lavoro è di analizzare se il GBV-C influenzi l'espressione dei geni dell'IFN e dei geni ad esso relati e di valutare se il plasma contenente tale virus sia capace di stimolare la produzione dell'IFN.

Metodi. I livelli di endogeni degli mRNA dei geni dell'IFN-alfa e -gamma e di alcuni geni ad essi relati (PKR, OligoAS, IFNAR-1, MxA) sono stati misurati nei PBMC di pazienti GBV-C positivi e negativi HIV coinfecti, mediante real-time RT-PCR. Su una parte di questi pazienti è stata ripetuta l'analisi a tempi successivi, per valutare se il cambiamento di stato viremico riguardo al GBV-C corrispondeva a cambiamenti di espressione dei geni in analisi. È stata inoltre ana-

103

FREQUENZA DEGLI ANTICORPI ANTI-MUSCOLO LISCIO (ASMA) IN PAZIENTI AFFETTI DA CITOMEGALOVIRUS (CMV)

Kiagiadaki C., Drygiannakis I., Drygiannakis D.

Reparto di Microbiologia,

Ospedale Generico di Rethymno, Via Trandalidou 17, 74100 Rethymno, Creta, Grecia

Introduzione. Gli anticorpi anti-muscolo liscio sono anticorpi non organo specifici. Secondo Botazzo usando il metodo di immunofluorescenza su sezioni criostatiche di rene di ratto ne sono stati identificati tre tipi:

lizzata la capacità del GBV-C di stimolare in vitro la produzione di IFN su PBMC di donatori sani.

Risultati. I risultati indicano un significativo aumento dei valori di espressione dell'IFN-gamma nei pazienti GBV-C positivi. Tale aumento correlava con l'espressione di tutti gli altri geni tranne che con l'MxA e l'IFN-alfa, suggerendo una attivazione coordinata di questi geni guidata dall'IFN-gamma. Nei pazienti di cui era disponibile un prelievo a tempi successivi, si è riscontrato che la perdita/acquisizione del GBV-C era associata ad una diminuzione/aumento dei livelli di espressione di questi geni. Nei PBMC di donatori sani messi in contatto con plasma contenente GBV-C si è riscontrata una stimolazione della produzione di IFN-gamma.

Conclusioni. I nostri studi, sia ex vivo che in vitro, dimostrano un aumento dell'espressione dell'IFN-gamma collegata alla presenza del GBV-C. Tale fenomeno potrebbe essere coinvolto nell'azione protettiva del GBV-C sulla progressione dell'infezione di HIV.

105

CASI DI IgM ROSOLIA POSITIVE IN GRAVIDANZA: PROBLEMATICHE INTERPRETATIVE

Leone R.A., Minchella P., Nisticò S., Potente G.I., Borelli A., Caruso V., Caruso D., Camerino M., Carlei M.L., Piccoli M., Mustaro C., Gagliardi B., Nicolazzo A., Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, Azienda Sanitaria N. 6, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Introduzione. La maggior parte dei casi di Rosolia Congenita si verifica come conseguenza di una infezione materna primaria, anche se sono segnalati casi estremamente rari in nati da madre con pregressa immunità, conseguenza di reinfezioni. La Rosolia in gravidanza va sospettata con un risultato di positività IgM; occorreranno poi ulteriori indagini per confermare o escludere la diagnosi di infezione recente. Difficoltà d'interpretazione del test sierologico possono aversi sia per diversa sensibilità e specificità dei metodi utilizzati, sia perché le IgM possono essere presenti un anno o più dopo l'infezione, la vaccinazione o dopo una reinfezione asintomatica. È essenziale che i risultati dei tests siano inquadrati nel contesto clinico ed anamnestico, per evitare errori interpretativi e minimizzare l'ansia della gestante. Scopo del lavoro è descrivere sei casi di gravide nel primo trimestre gestazionale con IgM Rosolia positive, osservate nel periodo gennaio-aprile 2006.

Metodi. A) Vidas Rub IgG II (P > 15) e Vidas Rub IgM (P > 1,20), metodo ELFA (Biomérieux); B) Rubella IgG Avidity Chorus (Forte > 40%), metodo EIA (Diasia); C) Virus Rosolia Amplificazione Nested, metodo RT-PCR (Amplimedical).

Risultati. Le informazioni cliniche ed i risultati dei test di laboratorio sono mostrati nella tabella.

PZ	Vac	I Pre	IgM	IgG	Avid	RNA
1	S	S	P (2,20)	15	ND	N
2	N	S	P (1,45)	> 400	90	N
3	S	S	P (5,80)	42	85	N
4	N	S	P (1,26)	110	86	N
5	N	S	P (3,74)	240	80	N
6	N	S	P (1,29)	51	56	N

Tabella. Vac: Vaccinazione; Avid.: Avidità IgG (%); I Pre: Immunizzazione pregravidica; ND: non determinabile; RNA: RT-PCR Virus Rosolia.

Tutte presentavano contemporanea presenza di IgM ed IgG, senza significative variazioni di titolo ad un secondo prelievo dopo venti giorni. L'Avidità era forte in n. 5 pazienti, solo in n. 1 non determinabile (ND). Da un'accurata indagine anamnestica risultava che n. 2 erano state vaccinate da più di 3 anni e che n. 4 avevano immunizzazione pregravidica. Dai dati ottenuti non vi era presumibile evidenza di Rosolia recente (primaria o reinfezione).

Discussione e Conclusioni. Questi casi dimostrano che spesso risultati positivi per IgM in gravidanza non riflettono una infezione recente: il valore predittivo positivo in caso di immunizzazione pregravidica è ridotto e quindi un ulteriore test di screening in gravidanza è indicato solo in caso di sospetta reinfezione.

106

CONFRONTO TRA IL TEST ABBOTT REAL-TIME HCV-RNA E IL DOSAGGIO VERSANT b-DNA v.3

Manzin A.¹, Marinelli K.¹, Vecchi M.¹, Pulvirenti F.R.², Valardo P.E.¹

¹Laboratorio di Virologia, Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche, Ancona.

²Abbott Molecular, Roma

Introduzione. La determinazione della carica virale di HCV è uno degli ambiti dove la tecnologia in real-time può offrire indubbi vantaggi. I dosaggi in real-time, per l'ampio intervallo lineare e la spiccata sensibilità, consentono infatti di superare l'attuale dicotomia di utilizzo di test qualitativi (altamente sensibili) e quantitativi (con sensibilità insufficiente a verificare l'eradicazione dell'infezione). Sono state valutate le prestazioni di Abbott Real-Time HCV-RNA, un dosaggio basato su estrazione automatica e probe lineari fluorescenti (range dinamico con volume iniziale 0,5 ml=12-10⁸ UI/mL). La chimica non esonucleasica del test, consente, attraverso uno step di ibridizzazione/lettura posto a 35°C, di quantificare correttamente target con "mismatches" nella regione di ibridizzazione del probe, offrendo una salvaguardia in più nei confronti della diversità genetica.

Metodi. 68 campioni retrospettivi da pazienti con infezione da HCV, già testati con b-DNA v3, sono stati analizzati con Abbott Real-Time (volume iniziale 0,2 mL, range 30-10⁸ UI/mL).

Risultati. Per i 32 campioni con valore compreso nel range dinamico di entrambi i test, il coefficiente di correlazione r è stato pari a 0,990. Il 96,9% (31/32) dei campioni ha mostrato una differenza inferiore a 0,5 log (84% inferiore a 0,3 log). La differenza media Abbott-bDNA è stata di 0,14 log UI/mL (DS=0,16 log). Dei 36 campioni con b-DNA <615 UI, 30 sono risultati con valori <30 UI/mL (4 con target rilevato) e 6 con risultato quantificabile (78, 83, 206, 438, 513, 1170 UI/mL) con il test real-time.

Conclusioni. Il dosaggio Abbott Real-Time ha mostrato un'eccellente correlazione con il test b-DNA v.3.

L'espressione dei risultati in UI permette, nonostante il differente principio dei test, di ottenere risultati confrontabili (bias=0,15 log). Come atteso, fatta salva la specificità del dosaggio, sono stati rilevati campioni con livelli viremici bassi (confermati con saggio RT-PCR qualitativo), determinati solo con test in real-time.

107

INFEZIONE DA HIV2 E MANAGEMENT CLINICO-DIAGNOSTICO-TERAPEUTICO

Giglio S., Raimondi T., Scerbo P., Della Dora N., Lepore M.G., Pascale F., Colosimo M., Dragone M., Rondinelli V., De Fazio E., Caruso G., Astorino G., Riillo G., Masciari R.

Virologia e Microbiologia

Malattie Infettive

Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio Presidio Pugliese,
Via Pio X, 88100 Catanzaro

Introduzione. HIV è un retrovirus, genere lentivirus, responsabile dell'AIDS. È suddiviso in due ceppi: HIV1 e HIV2. Il primo è prevalentemente localizzato in Europa, America ed Africa Centrale; il secondo si trova per lo più in Africa Occidentale.

Entrambi determinano una sindrome sovrapponibile ma quella provocata dall'HIV2 ha caratteristiche di maggiore moderazione e minore patogenicità. L'immunodepressione conseguente all'infezione da HIV2 consta infatti di un decremento annuo medio di CD4+ pari all'1% contro il 10% dell'HIV1.

La stessa progressione in AIDS è pari allo 0,5% /anno contro il 3-5% /anno dell'HIV1.

Casi clinici. Nel reparto di Malattie Infettive sono stati ricoverati (uno nel 1996, l'altro nel 2005) due senegalesi di sesso maschile, rispettivamente di 26 e 32 anni di età, per febbre, dimagrimento, astenia, linfadenopatia generalizzata e candidosi oro-faringo-esofagea.

I CD4+ erano pari a 20 ed a 24/mm³ e la positività per HIV2-Ab veniva evidenziata in Western Blot dalla presenza della banda gp36. La carica virale risultava falsamente negativa (il kit Roche è per HIV1) mentre i valori dei linfociti CD8+CD38+ deponevano per una intensa replicazione virale.

La terapia HAART è stata quindi iniziata senza il conforto del test di farmacoresistenza (anche il tentativo di sequenziamento del DNA provirale non ha avuto successo).

Paziente n° 1: Indinavir + AZT + 3TC

Paziente n° 2: Lopinavir/Ritonavir + AZT + 3TC

I CD4+ di entrambi i pazienti sono stabilmente superiori a 600/mm³ e le cellule T naive (CD4+CD45RA+CD62L+) sono molto più numerose delle T memory (CD4+CD45RO+CD62L-), segno di una soddisfacente ricostituzione immunologica.

Conclusioni. I nostri casi clinici confermano che il decorso dell'infezione da HIV2 è più benigno di quello dell'HIV1.

Le indagini citofluorimetriche sui CD4, CD8, CD45, CD38 e CD62L (selectina) consentono, anche nell'impossibilità di monitorare la risposta virologica, di valutare comunque l'efficacia della terapia HAART e l'adesione al trattamento farmacologico.

108

PREVALENZA DI AGENTI RESPIRATORI IN CAMPIONI DEL TRATTO RESPIRATORIO INFERIORE DI PAZIENTI OSPEDALIZZATI

Minosse C.¹, Selleri M.¹, Zaniratti M.S.¹, Cappiello G.², Longo R.², Schifano E.³, Visca M.², Cava M.², Petrosillo N.⁴, Gualano G.⁵, Spanò A.², Lauria F.N.⁵, Puro V.³, Capobianchi M.R.¹

¹ Laboratorio di Virologia; INMI L. Spallanzani;
Via Portuense 292, 00149 Roma

² Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Immunologia;
Ospedale Sandro Pertini; Via dei Monti Tiburtini, 00157 Roma

³ Dipartimento di Ricerca Sperimentale; INMI L. Spallanzani;
Via Portuense 292, 00149 Roma

⁴ II Divisione; INMI L. Spallanzani; Via Portuense 292,
00149 Roma;

⁵ Divisione Mal. App. Resp.; INMI L. Spallanzani;
Via Portuense 292, 00149 Roma

Introduzione. Le infezioni del tratto respiratorio inferiore sono causa di morbidità la cui eziologia rimane non determinata in più del 50% dei casi. In questo studio abbiamo valutato, in pazienti ospedalizzati, mediante metodi molecolari, la prevalenza di agenti virali a tropismo respiratorio.

Metodi. Sono stati raccolti consecutivamente 480 campioni (321 espettorati, 140 aspirati endotracheali e 19 lavaggi broncoalveolari) pervenuti consecutivamente al laboratorio, durante il periodo aprile 2004-maggio 2005. La raccolta dei campioni aveva un chiaro andamento stagionale, con un picco invernale. Sono stati ricercati, mediante PCR o RT-PCR, i seguenti virus: adenovirus, influenza A e B, metapneumovirus, parainfluenza-1, 2 e 3, virus respiratorio sinciziale, rhinovirus, i coronavirus umani OC43, 229E, NL63. Inoltre sono stati ricercati i genomi di *Clamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Legionella pneumophila*.

Risultati. Su un totale di 480 campioni raccolti, 234 (48.7%) risultavano positivi per uno o più virus: 182 (37.9%) Rhino; 52 (10.8%) Influenza A; 5 (1%) Influenza B; 7 (1.5%) Adenoviruses; 1 (0.2%) RSV tipo B; 6 (1.2%) Parainfluenza 1; 1 (0.2%) Parainfluenza 3; 5 (1%) OC43 e 10 (2.1%) NL63. *Clamydophila* e *Mycoplasma pneumoniae* sono stati identificati in 3 campioni. Coinfezioni sono state rilevate in 39 campioni (8.1%): Rhino+InfA (20), Rhino+InfB (3), Rhino+NL63 (3), Rhino+Adeno (2), Rhino+Chlamydia (2), Rhino+Mycoplasma (2), Rhino+Para1 (1), Rhino+RSV (1), Rhino+OC43 (1), InfA+OC43 (1), Adeno+NL63 (1), Rhino+InfA+Para1 (1), Rhino+InfA+Adeno (1).

Conclusioni. Dallo studio emerge che una quota rilevante di campioni provenienti dalla basse vie respiratorie di pazienti adulti ricoverati per vari motivi, ma accomunati dalla presenza di patologia respiratoria, presenta infezioni virali, spesso in associazione tra loro o con altri microrganismi. Tra questi, il più frequente è risultato il Rhinovirus, seguito dai virus influenzali e dal coronavirus NL63.

109

TEST RAPIDO PER L'INFLUENZA E APPROCCIO MOLECOLARE MULTIPARAMETRICO PER LA DIAGNOSI Eziologica DELLE ILI

Minosse C.¹, Zaniratti M.S.¹, Pisciotto M.¹, Carletti F.¹, Shi W.¹, Gualano G.³, Sciarra F.⁴, Boschi A.⁴, Passariello F.⁴, Buscaioni M.⁴, Ippolito G.², Capobianchi M.R.¹, Lauria F.N.³

¹Laboratorio di Virologia, INMI L. Spallanzani, Via Portuense 292, 00149 Roma;

²Dipartimento di Ricerca Sperimentale, INMI L. Spallanzani, Via Portuense 292, 00149 Roma;

³Divisione Mal. App. Resp., INMI L. Spallanzani, Via Portuense 292, 00149 Roma;

⁴Az. USL RM/D, Roma

Introduzione. Numerosi virus possono essere implicati nella eziologia della sindrome influenza-simile (ILI). Alcuni studi indicano l'utilità dei test rapidi, il cui valore predittivo dipende dalla prevalenza. Abbiamo effettuato una prova di campo per valutare l'introduzione nella pratica clinica di un test rapido per influenza in contesto epidemico, usando in parallelo un pannello per la diagnosi molecolare dei virus respiratori

Metodi. Nel periodo 25/2/06-26/4/06 sono stati raccolti 33 tamponi nasofaringei da pazienti rispondenti alla definizione di ILI (InFluNet). Il test rapido è stato affiancato da un pannello molecolare per influenza A e B, parainfluenza 1-2-3, virus respiratorio sinciziale, metapneumovirus, rhinovirus, coronavirus OC43, 229E e NL63, adenovirus.

Risultati. Dei 33 analizzati, 24 campioni (72,7%) erano positivi ad almeno un virus. Sette (20,6%) presentavano una doppia positività, comprendente generalmente un rhinovirus. Sono stati individuati 11 casi di influenza (32,2%, 9 da virus A e 2 da virus B), di cui, 8 A e 1 B confermati con sequenziamento del gene M. Solo 3 casi di influenza A sono stati rilevati anche dal test rapido.

Conclusioni. L'esiguo numero di pazienti analizzati e la bassa attività della stagione influenzale hanno permesso di pervenire a risultati solo parziali e non conclusivi. È stata evidenziata:

1) una notevole variabilità di virus associati alla definizione sindromica ILI; i virus più frequenti sono i rhinovirus (41,1%), seguiti dall'influenza A (26,4%).

2) la fattibilità dell'introduzione nella pratica clinica di un test rapido per influenza.

Dato l'esiguo numero di pazienti non è possibile fare valutazioni di sensibilità e specificità del test rapido.

Viene, infine, sottolineata l'utilità dell'uso di pannelli molecolari ampi per la diagnosi eziologica delle forme respiratorie acute, soprattutto per conferma e/o esclusione nel contesto di una emergenza pandemica.

Gli AA. reputano opportuno ampliare l'analisi, studiando un campione più ampio ed in un contesto epidemico caratterizzato da elevata attività.

111

SOTTOTIPI NON-B DI HIV TRA I PAZIENTI ITALIANI E STRANIERI AFFERENTI ALL'OSPEDALE DI NOVARA

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

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

Introduzione. Si conoscono 9 differenti sottotipi di HIV-1 gruppo M, (classificati con le lettere A-K), e almeno 21 sottotipi ricombinanti (CRF). In Italia prevale il sottotipo B, ma da anni si riscontra un costante aumento dei sottotipi non-B.

In base a numerosi recenti lavori, la definizione del sottotipo virale risulta avere importanti conseguenze cliniche e terapeutiche. Ad esempio, alcuni sottotipi C presentano resistenza naturale agli NNRTI per la presenza del polimorfismo G190A. Anche il sottotipo G presenta il polimorfismo V82I, che favorisce l'insorgenza di resistenza ai PI. Inoltre, differenti sottotipi possono presentare differenti pathways di resistenza (ad esempio, nel sottotipo G, la terapia con NFV induce più facilmente la mutazione L90M rispetto alla D30N; e nel sottotipo C trattato con Efavirenz è frequente la mutazione V106M che induce resistenza a tutti gli NNRTI).

Metodi. In questo studio abbiamo verificato la presenza di sottotipi non-B nella popolazione con infezione da HIV-1 afferente all'Ospedale di Novara.

Risultati e conclusioni. Il sequenziamento di 403 campioni di differenti pazienti in cinque anni ci ha permesso di verificare la presenza del 92,3% di sottotipi B e del 7,7% di sottotipi non-B (31 casi).

Tra i sottotipi non-B, quelli di più frequente riscontro sono risultati il sottotipo ricombinante CRF02_AG (9 casi), e il sottotipo F (7 casi). Sottotipi meno diffusi sono risultati: G (5 casi), C (4 casi), D (3 casi), CRF01_AE (2 casi), K (1 caso).

Dividendo questi dati a seconda dell'anno di diagnosi del sottotipo, notiamo un aumento nel corso degli anni (0 nel 2001; 4 nel 2002; 5 nel 2003; 10 nel 2004; 12 nel 2005).

Un altro dato interessante è la distribuzione di questi sottotipi in base all'origine etnica: 15 risultano essere italiani, e 16 extracomunitari. Tutti i casi di sottotipo F, K, 4 su 9 di sottotipo CRF02_AG, e 3 su 4 di sottotipo C sono stati riscontrati in pazienti italiani; mentre tutti i casi di sottotipo D, G, CRF01_AE, 5 su 9 di sottotipo CRF02_AG, e 1 su 4 di sottotipo C sono stati riscontrati in pazienti extracomunitari.

STUDIO MULTICENTRICO DI VALUTAZIONE DI UN TEST RAPIDO IMMUNOCROMATOGRAFICO PER LA RICERCA DI ANTICORPI ANTI HIV.

Callegaro A.,¹ Barera O.,² Campisi D.,³ Capobianchi M.R.,⁴ Clerico L.,⁵ Guazzotti G.,⁶ Kafmann E.,⁷ Passerini Tosi C.,¹ Reatto P.,⁸ Tedeschi R.M.,⁹ Vezzo R.,¹⁰ Goglio A.¹

¹Microbiologia e Virologia Bergamo,

²Microbiologia San Carlo Borromeo Milano,

³Microbiologia Niguarda Milano,

⁴Virologia I.N.M.I.L. Spallanzani Roma,

⁵Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia Pescara,

⁶Microbiologia Vercelli,

⁷Microbiologia Bolzano,

⁸Microbiologia Vicenza,

⁹Microbiologia Immunologia e Virologia CRO Aviano,

¹⁰Microbiologia San Gerardo Monza.

Introduzione. I test rapidi per la ricerca di anticorpi anti HIV 1 e 2 sono caratterizzati da facilità di esecuzione e non richiedono strumentazione aggiuntiva. EQUI-HIV 1&2 è un test qualitativo rapido per la determinazione di anticorpi anti HIV-1 e 2 nel siero umano. Si riportano i dati di uno studio multicentrico per la valutazione di EQUI-HIV 1&2 nei confronti di test immunoenzimatici e test di conferma.

Metodi. Ciascun centro ha eseguito in doppio, su campioni freschi e/o congelati, il test di screening in uso (per HIV-Ab o HIV-Ab più HIV-Ag) e il test rapido. Per l'esecuzione di EQUI-HIV 1&2 e l'interpretazione dei risultati si sono seguite le istruzioni della ditta produttrice. Per le reattività dubbie a 15' la lettura del risultato è stata effettuata dopo 30'.

Sui campioni positivi e/o discordanti è stato eseguito il test di conferma (Immunoblot) e HIV-RNA se richiesto.

Risultati. I risultati, ottenuti su 456 campioni analizzati, vengono riportati nella tabella seguente

N	EIA Combo	EQUI -HIV	Immunoblot
269	N	N	-
156	P	P	P
6	P	P	N
24	P	N	N
1	N	P	N

I test di screening di quarta generazione hanno ottenuto una sensibilità e specificità del 100% e 90% vs test di conferma. Sensibilità e specificità di EQUI HIV-1&2 nei confronti del test di conferma è stata del 100% e 97,7%. Comunque dei 24 campioni positivi solo con i test immunoenzimatici 3 appartenevano a pazienti con infezione acuta da HIV in presenza di sindrome mononucleosica e HIV-RNA quantificabile.

Conclusioni. Il test rapido da noi valutato ha dimostrato piena affidabilità nella ricerca di anticorpi anti HIV 1 e 2. I vantaggi sono legati alla semplicità e velocità di esecuzione, lo svantaggio, rispetto ai test immunoenzimatici di quarta generazione oggi ampiamente utilizzati, è la mancata rilevazione di antigeni con conseguente zona grigia più ampia.

STUDIO DI PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA HCV E HBV IN UN'AREA DELLA CAMPANIA AD ELEVATA INCIDENZA DI EPATOCARCINOMA. RISULTATI PRELIMINARI

Pisanti F.A.^{1a}, Quatrano P.^{1a}, Piselli P.^{2a}, Maione C.^{1b}, Fusco M.^{1b}, Palombino R.^{1c}, Girardi E.^{2a}, Scognamiglio P.^{2a}, Barzoni Secchia S.^{2a}, Bellelli S.^{2a}, Polesel J.³, Solmone M.C.^{2b}, Capobianchi M.^{2b}, Ippolito G.^{2a}, Serraino D.³

^{1a}ASL Napoli 4, ^{1a}) Servizio Patologia Clinica Territoriale,

^{1b}) Registro Tumori Regione Campania, ^{1c}) Servizio Epidemiologia

²INMI "L. Spallanzani" IRCCS, Roma, ^{2a}) Epidemiologia Clinica,

^{2b}) Laboratorio Virologia

³IRCCS Centro di Riferimento Oncologico, Aviano,

SOC Epidemiologia e Biostatistica

Introduzione. Il Registro Tumori di Popolazione della Campania ha rilevato nella sua area di riferimento (Azienda Sanitaria Locale Napoli 4) tassi di incidenza e mortalità per epatocarcinoma circa doppi rispetto ai dati italiani. Posto che l'infezione da HCV è noto fattore di rischio per tale patologia neoplastica, è stato condotto uno studio di popolazione.

Metodo. Un campione casuale di 9996 soggetti stratificati per sesso, età e distretto sanitario di appartenenza, e pesato per la prevalenza attesa di infezione da HCV, è stato estratto dai 370.846 residenti di età >19 anni. Hanno accettato di partecipare allo studio 4972/9253 soggetti, di questi 4517 hanno effettuato alcuni esami di laboratorio (anti-HCV, HBsAg, HbsAb, HbcAb totali, ALT, AST, ecc.). Sono stati utilizzati i sistemi analitici Integra 800 e Cobas Core II (Roche). I sieri anti-HCV positivi sono stati saggiati per la ricerca del virus (PCR) e la sua genotipizzazione.

Risultati. Anticorpi anti-HCV sono stati rinvenuti in 388 dei 4513 soggetti testati (pari all'8.6% del campione), mentre 100 persone (2.2%) sono risultate positive per l'HBsAg. È in corso la conferma (RIBA) dei campioni positivi per anti-HCV e negativi alla PCR (98/388). Il genotipo 1 è stato riscontrato nel 61.6% dei campioni (1B=54%), il genotipo 2 nel 36.9% dei campioni. La prevalenza incrementa con l'avanzare dell'età, da <2% nella fascia d'età <45 anni, al 15.1% nella fascia 55-64 anni, al 25% nei soggetti di 75-79 anni. Al momento dello screening il 55% dei soggetti positivi per anti-HCV non sapevano di esserlo. La positività per l'HBsAg è risultata più frequente negli uomini (2.7%) che nelle donne (1.8%) (p=0.07) con un massimo nel gruppo d'età 45-54 anni (4%). Il 27.3% degli individui testati ha anticorpi anti-HBc, il 21.2% risulta solo HbsAb positivo. Il 51.2% degli individui testati non risultano essere venuti a contatto con il virus HBV (HBsAg-/HbsAb-/HBcAb-).

Conclusioni. Lo studio mostra un'elevata prevalenza di infezione da HCV e HBV nella popolazione generale dell'area di riferimento del Registro Tumori della Regione Campania.

114

DIAGNOSI SIEROLOGICA DI INFEZIONE DA VIRUS DEL MORBILLO: CONFRONTO TRA IMMUNOFLUORESCENZA ED IMMUNOENZIMATICA (CHORUS) - RISULTATI PRELIMINARI

Tognini M.¹, Pistono P.G.², Martorana M.², Matera B.², Piro F.²¹DIESSE S.p.A. Via delle Rose 10

- 53035 Monteriggioni (Siena) - Italy

²Laboratorio di Virologia e Microbiologia

Ospedale di Malattie Infettive Amedeo di Savoia (ASL 3)

corso Svizzera 164 - 10149 Torino

L'incidenza del Morbillo in Italia in era prevaccinale era approssimativamente di 150 casi ogni 100 000 abitanti; a seguito dell' introduzione della vaccinazione volontaria nel 1976 è andata significativamente riducendosi fino a 46 casi / 100 000 abitanti nel periodo 1990-96. Attualmente circa il 56% dei bambini italiani risulta vaccinato con tuttavia notevoli variazioni da una regione all'altra.

L'immunità acquisita in seguito ad infezione o a vaccinazione, permane per tutta la vita. Le metodiche oggi maggiormente usate per la ricerca di IgG ed IgM anti-morbillo comprendono l'Immunofluorescenza indiretta (IFA), la Radioimmunologia (RIA) e l'Immunoenzimatica (ELISA).

Nel nostro studio abbiamo confrontato i risultati delle nostre determinazioni in IFA con la nuova metodica ELISA applicata allo strumento Chorus (DIESSE).

Materiali e Metodi. Abbiamo sottoposto a ricerca delle IgG anti-Morbillo n° 84 sieri IgG positivi ed IgM negativi e n° 27 sieri IgG ed IgM negativi conservati nella nostra sieroteca; ed alla ricerca di IgM anti-Morbillo n° 45 sieri IgM ed IgG positivi provenienti da soggetti con sospetta infezione acuta da Morbillo e n° 31 IgM ed IgG negativi. Abbiamo valutato la sensibilità e la specificità del nuovo test immunoenzimatico (CHORUS) rispetto all'IFA, considerata come metodo di riferimento.

Risultati. Ricerca IgG anti-Morbillo: su 84 campioni positivi in IFA, 83 sono risultati positivi e 1 negativo con il Chorus mentre i 27 campioni negativi sono risultati negativi anche con il Chorus (sensibilità 98,8 %, specificità 100 %). Ricerca IgM anti-Morbillo: tutti i 45 campioni positivi in IFA sono risultati positivi anche con il Chorus, mentre i 31 campioni negativi con l'IFA erano negativi anche con il Chorus (sensibilità e specificità 100%).

Conclusioni. La ricerca di IgG ed IgM anti-Morbillo con metodo ELISA con lo strumento Chorus rappresenta un'ottima alternativa alla Immunofluorescenza in termini di sensibilità e specificità, con il vantaggio dell'automazione e di una maggiore rapidità di esecuzione.

115

DIAGNOSI SIEROLOGICA DI INFEZIONE DA VARICELLA-ZOSTER VIRUS: CONFRONTO TRA IMMUNOFLUORESCENZA ED IMMUNOENZIMATICA (CHORUS) - RISULTATI PRELIMINARI

Tognini M.¹, Pistono P.G.², Martorana M.², Pilla C.², Piro F.²¹DIESSE S.p.A. Via delle Rose 10 - 53035 Monteriggioni (Siena) - Italy²Laboratorio di Virologia e Microbiologia

Ospedale di Malattie Infettive Amedeo di Savoia (ASL 3)

corso Svizzera 164 - 10149 Torino

Introduzione. Le infezioni da Varicella-Zoster virus (VZV), rappresentano a tutt'oggi un problema di interesse per la Sanità Pubblica per la elevata contagiosità delle forme acute, le conseguenze delle recidive (Herpes-Zoster) soprattutto nei soggetti immunocompromessi, e le implicanze a volte di rilievo in gravidanza. La diagnostica si basa essenzialmente sulla ricerca degli anticorpi specifici. Le metodiche maggiormente usate comprendono Immunofluorescenza indiretta (IFA), Immunoenzimatica (ELISA) e Radioimmunologia (RIA). Nel nostro studio abbiamo confrontato i risultati delle nostre determinazioni di IgG ed IgM anti-VZV in IFA con la metodica ELISA applicata allo strumento Chorus (DIESSE).

Materiali e Metodi. Abbiamo ricercato IgG anti-VZV in 68 sieri IgG positivi ed IgM negativi e 19 sieri IgG ed IgM negativi conservati nella nostra sieroteca; e ricercato IgM anti-VZV in 43 campioni IgM ed IgG positivi provenienti da soggetti con sospetta infezione acuta da VZV e in 32 campioni IgM negativi, valutando la sensibilità e la specificità del nuovo test immunoenzimatico (CHORUS) rispetto all'IFA, considerata come metodo di riferimento.

Risultati. Nei 68 campioni VZV IgG positivi, la ricerca delle IgG anti-VZV con Chorus forniva un risultato positivo in 61 casi, negativo in 2 casi e indeterminato in 5 casi, mentre tutti i 19 campioni VZV IgG negativi in IFA risultavano negativi anche con il Chorus (sensibilità 89,7 %, specificità 100%). Erano discordanti i campioni con titoli £ a 1/32. La ricerca con il Chorus delle IgM anti-VZV nei 43 campioni positivi con l'IFA era positiva in 42 campioni mentre era negativa in 31 dei 32 campioni negativi con l'IFA (sensibilità 98,0%, specificità 96,9 %).

Conclusioni. IFA è una metodica sensibile e specifica, la cui esecuzione tuttavia richiede tempo e personale esperto dedicato; l'ELISA applicata allo strumento Chorus può rappresentare una valida alternativa per la sua velocità di esecuzione e il ridotto impiego di risorse umane, fornendo sensibilità buona e specificità ottima.

116

INCIDENZA DI INFEZIONE PERINATALE DA CMV: DUE ANNI DI ESPERIENZA

Pollara C., Perandin F., Cariani E., Terleghi L., Gargiulo F., Bonfanti C., Manca N

Servizio di Microbiologia e Virologia, A. O. Spedali Civili Brescia, 25123 Brescia

Introduzione. Il CMV è l'agente più importante di infezione congenita e perinatale con un'incidenza media dell'1% (0.3-2%) dei nati vivi. Anche se solo il 10-15% dei neonati infetti presenta sintomi alla nascita, circa il 50% di essi ha come deficit uditivo primario la sordità e circa il 10% dei nati asintomatici alla nascita svilupperà sordità neurosensoriale e ritardo psicomotorio.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare retrospettivamente la prevalenza di infezione da CMV su bambini nati sintomatici e asintomatici e la sua correlazione con lo sviluppo di sequele.

Materiali e Metodi. Sono stati valutati 245 neonati, nati da donne con sospetta infezione da CMV durante la gravidanza, afferenti all'Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia nel periodo gennaio 2004- maggio 2006. La diagnosi di infezione perinatale da CMV è stata valutata mediante isolamento del virus dalle urine prelevate entro la terza settimana di vita. In caso di positività i neonati sono stati inseriti in un programma di follow up clinico-diagnostico. Il protocollo diagnostico prevedeva oltre all'isolamento virale, la ricerca della proteina pp65 (antigenemia) e la ricerca quantitativa del DNA mediante realtime PCR.

Risultati. Su 245 bambini studiati 8 (3.3%) sono risultati positivi all'isolamento virale, tutti sono risultati positivi alla realtime PCR (sensibilità 100%) mentre 1 neonato è risultato positivo all'antigenemia (12.5% sensibilità). I valori di qDNA ottenuti in 4 neonati erano <1000 copie/ml mentre era notevolmente più alto nei 4 campioni residui: >10000 copie/ml.

Conclusioni. La prevalenza dell'infezione da CMV sul campione di neonati presi in esame è risultata pari al 3.3%, 7 neonati sono risultati asintomatici e non hanno mostrato segni di sequele neurologiche né alla nascita né al follow-up, solo 1 neonato è risultato sintomatico ma a tutt'oggi non presenta danni neurologici ed è ancora sotto osservazione.

117

VALUTAZIONE DELLA LINEARITÀ DEL SISTEMA COBAS TAQMAN HBV PER ALTI VALORI DI VIREMIA

Ravanini P., Nicosia A.M., Crobu M.G., Cagliano M., Kroumova V., Grasso S.

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

Introduzione. Per il monitoraggio del trattamento delle infezioni croniche da HBV le linee guida prevedono la determinazione periodica della viremia. Il successo della terapia viene valutato in base al valore soglia di 10^5 copie/ml. Anche altri valori sono però importanti per il monitoraggio: la viremia iniziale, di qualsiasi grado, è fondamentale per verificare la caduta di 1 Log della viremia in terapia, indice considerato importante per la valutazione della risposta. Viremie basali $>10^5$ copie/ml sono indicative di alta probabilità di relapse; e viremie $<10^5$ copie/ml rispondono meglio alla terapia con Interferone. Questi dati indicano l'importanza di effettuare dosaggi corretti di viremia con ampio range lineare.

Uno dei sistemi in Real-Time PCR per il dosaggio della viremia di HBV-DNA è il test Cobas TaqMan HBV. Il range lineare, dichiarato dall'azienda, si spinge fino a $1,1 \times 10^8$ U.I./ml.

Metodi. In questo studio abbiamo valutato l'effettiva linearità del sistema per alte viremie. Tra dicembre 2005 e marzo 2006 abbiamo selezionato 21 campioni di plasma con viremie superiori al limite massimo del sistema Cobas TaqMan ($>1,1 \times 10^8$ U.I./ml).

Per nostra scelta, al fine di fornire sempre al clinico un valore di viremia, in questi casi abbiamo proceduto con diluizioni 1:1000 su altre aliquote degli stessi campioni, e al successivo dosaggio con lo stesso metodo, applicando il fattore di diluizione.

Risultati. Di questi campioni, 10 sono risultati nel secondo dosaggio effettivamente superiori a $1,1 \times 10^8$ U.I./ml, non in contrasto quindi con la prima determinazione (range tra $1,2 \times 10^8$ e $2,1 \times 10^{10}$).

I restanti 11 campioni sono invece risultati inferiori a $1,1 \times 10^8$ U.I./ml, dimostrando quindi una discrepanza con quanto indicato dalla prima determinazione (range tra $6,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^8$). In particolare, 4 campioni sono risultati inferiori a $3,5 \times 10^7$ (meno di 1/3 del precedente valore limite), con differenze sicuramente $>0,5$ Log; e 1 campione è risultato $6,5 \times 10^6$, (1/17 del precedente valore limite), con differenza >1 Log.

Conclusioni. Questi dati ci sembrano indicare una non analoga risposta di linearità del sistema tra campioni con basse e con alte viremie. La linearità del sistema andrebbe quindi rivalutata per definire più correttamente il limite massimo del range di dosaggio.

118

CONFRONTO TRA SISTEMI DIAGNOSTICI MOLECOLARI PER LA DEFINIZIONE DELLA VIRAL LOAD DI HCV: COBAS AMPLICOR MONITOR HCV 2.0, VERSANT B-DNA HCV 3.0, E COBAS TAQMAN HCV

Ravanini P.¹, Milano F.², Caviglia F.², Grossini E.¹,
Nicosia A.M.¹, Crobu M.G.¹, Cagliano M.¹, Cusaro C.¹

¹Azienda "Ospedale Maggiore della Carità" - Novara
- Laboratorio Microbiologia e Virologia
²P.O. Sant'Andrea - Vercelli - Laboratorio di Microbiologia

Introduzione. La viremia di HCV-RNA è un parametro importante per impostazione e monitoraggio della terapia. Il dosaggio della viremia viene effettuato con metodi di PCR quantitativa end-point, di Branched-DNA, e nuovi metodi in PCR Real-Time. La definizione dello standard internazionale in U.I. ha avuto lo scopo di permettere la comparazione tra i risultati ottenuti dai differenti tests e di utilizzare i risultati di viremia indipendentemente dal test.

Metodi. In questo lavoro abbiamo verificato la possibilità di ottenere risultati comparabili con differenti tests, mediante due studi di confronto. Il primo ha confrontato i tests Versant HCV 3.0 e Cobas Monitor HCV 2.0, su 44 campioni con differenti genotipi. Il secondo ha confrontato i tests Versant HCV 3.0 e Cobas TaqMan HCV (70 campioni).

Risultati. Nel primo studio la media delle differenze ha fornito un valore di 1,22. Nel secondo confronto i valori forniti da Cobas TaqMan sono in media superiori di 7,39 volte rispetto a Versant HCV. I casi con differenza >0.5 Log nel primo confronto sono 5/44 (11%), mentre nel secondo sono 60/70 (86%).

Nel primo studio vi è ottima corrispondenza per i casi di genotipo 1 (ratio 0,99), mentre la differenza è più evidente per altri genotipi (genotipo 2: ratio 1,86 - genotipo 3: 1,46 - genotipo 4: 0,79). Nel secondo confronto, l'unico genotipo con differenze accettabili (<0.5 Log) è il genotipo 4, con differenza media di 2,0 volte. Gli altri genotipi presentano differenze non accettabili (genotipo 1: ratio 7,87; genotipo 2: 6,30; genotipo 3: 13,11).

Conclusioni. Vi sono quindi importanti differenze tra risultati ottenuti con i metodi Versant HCV e Cobas TaqMan (nell'86% differenze non accettabili). Le differenze risultano minori nel confronto tra Versant HCV e Cobas Monitor. Persistono inoltre importanti differenze di dosaggio a seconda del genotipo, maggiori nel secondo confronto. E' quindi peggiorata la possibilità di confronto dei risultati. I metodi b-DNA e Cobas Monitor sono più correlati tra loro e allo standard internazionale; mentre il sistema di Real-Time presenta differenze maggiori. La standardizzazione dei nuovi metodi non sembra quindi ancora conclusa. Riteniamo che vada ripresa per i metodi Real-Time, che per ora non sembrano confrontabili con altri sistemi standardizzati.

119

DIAGNOSI E TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DELL'HPV

Rimini E., Solinas M.L., Pinna A., Marogna M., Rubattu L.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ASL I - Sassari,
Via Monte Grappa 82, 07100 Sassari

Introduzione. Nelle donne la persistenza di infezione da HPV ad alto rischio aumenta la probabilità di sviluppare carcinoma cervicale; pertanto è utile un test di biologia molecolare che identifichi precocemente tali virus anche in soggetti asintomatici. Abbiamo testato campioni di cellule cervicali provenienti da donne con e senza sintomi, con un test di amplificazione per la rilevazione dell'HPV ad alto rischio e successiva genotipizzazione per HPV a basso, medio e alto rischio.

Materiali e metodi. Sono stati analizzati 96 campioni di cellule cervicali, raccolte in terreno liquido (Thin-prep). I campioni sono stati processati con il test "Amplicor HPV" (Roche) che amplifica il DNA bersaglio, utilizzando primers specifici per la regione polimorfica del gene L1 dell'HPV ad alto rischio (amplicone da 165 bp). Nella miscela di reazione sono inoltre presenti primers per l'amplificazione del gene della β -globina umana (amplicone da 268 bp) per fornire un controllo su idoneità, estrazione ed amplificazione delle cellule. Al termine della reazione, il DNA viene denaturato e successivamente ibridato con sonde oligonucleotidiche infine rivelato colorimetricamente su piastra.

I campioni di DNA estratti sono stati in seguito genotipizzati col test "Linear Array HPV Genotyping Test" (Roche). Il test permette di identificare 37 genotipi virali HPV a basso, medio ed alto rischio.

Risultati. Il 25% dei campioni è risultato positivo per HPV ad alto rischio ed ha confermato alla successiva genotipizzazione; un campione, negativo alla PCR per HPV ad alto rischio, è risultato positivo alla genotipizzazione per HPV a basso rischio (genotipi virali: 40 e 62).

Successivamente si è visto che la paziente presentava sintomi clinici.

Conclusioni. Dai dati preliminari, si evince che il test in biologia molecolare è sensibile, specifico e non invasivo per determinare la presenza di un'infezione cervicale attiva sostenuta da HPV. I risultati ottenuti erano in accordo con la diagnosi clinica.

Il prelievo in terreno liquido permette di conservare i campioni per diverse settimane, offrendo la possibilità di ripetizioni o analisi aggiuntive.

Inoltre la tipizzazione dell'HPV in soggetti citologicamente negativi può ridefinire gli intervalli di screening.

L'impiego di questo test in biologia molecolare è ancora utilizzato in specifici ambiti; un impiego come test di screening primario richiederebbe l'utilizzo di procedure automatizzate, standardizzate e di costo contenuto. Una maggiore diffusione ed automazione spinta di queste tecniche molecolari probabilmente porterà in tempi brevi ad un rapporto costo-efficacia sostenibile.

120

INCIDENZA HCV E HBV TRA I DIALIZZATI DELL'A.S. N° 9 LOCRI

Bonfà A.¹, Franco C.², Genovese A.¹, Romeo R.¹¹Centro Trasfusionale A.S. n°9 Ospedale Civile, Locri²Nefrologia e Dialisi A.S. n°9 Ospedale Civile, Locri

Introduzione. Presso il Centro Trasfusionale della Nostra Azienda eseguiamo gli esami su siero per la diagnostica delle epatiti virali e dell'anti-HIV, su siero o plasma, nei pazienti sottoposti a trattamento dialitico. Scopo del lavoro è seguire i pazienti nel corso del trattamento, evidenziandone eventuali contagi da epatite C.

Metodi. I pazienti sono attualmente 61 e vengono da noi esaminati all'ingresso del trattamento dialitico e successivamente ogni 4 mesi. Hanno un'età media di 61 anni, un'età media dialitica di 5 anni, sono per il 40% femmine e per il 60% maschi. Per la diagnostica delle epatiti virali e dell'anti-HIV utilizziamo i kit della ditta Roche, su apparecchiatura Cobas Core II, con metodica immunoenzimatica in fase solida. Per la ricerca dell'HCV-RNA quali-quantitativo su plasma utilizziamo il test Cobas Amplicor HCV Monitor (Roche). La genotipizzazione del virus C viene eseguita con il test Versant Genotype Assay Lipa (Bayer).

Risultati. I nostri pazienti ad oggi risultano essere tutti negativi al virus dell'epatite B e tra essi il 20% risulta essere immune naturalmente, il 30% ha risposto alla vaccinazione anti epatite B, il restante 50% non ha risposto alla vaccinazione.

Dei 61 pazienti l'8,1% risulta positivo all'anti-HCV. Il 20% dei positivi non presenta viremia, mentre l'80% presenta viremia e di essi il 50% appartiene al genotipo 2a/2c, l'altro 50% al genotipo 1b.

Conclusioni. Nonostante il problema delle infezioni da virus C, nei pazienti sottoposti a trattamento dialitico, rimanga di grande importanza clinica ed epidemiologica, il nostro Centro Dialisi ha portato ad una progressiva e significativa riduzione dell'incidenza della epatite C, adottando come misure di prevenzione l'uso di Monitors Dedicati.

121

IL TRATTAMENTO PRECOCE NELLE INFEZIONI ACUTE DA HIV-1 INCIDE SULLA MATURAZIONE DELLA RISPOSTA UMOREALE ANTI-HIV

Selleri M.¹, Zaniratti M.S.¹, Orchi N.², Corpolongo A.³, Zaccaro P.¹, Ippolito G.², Capobianchi M.R.¹, Girardi E.²¹Laboratorio di Virologia, INMI L. Spallanzani;

Via Portuense 292, 00149 Roma

²Dipartimento di Ricerca Sperimentale, INMI L. Spallanzani;

Via Portuense 292, 00149 Roma

³IV divisione, INMI L. Spallanzani,

Via Portuense 292, 00149 Roma

Introduzione. Nella prima fase delle infezioni, l'avidità degli anticorpi verso l'antigene aumenta progressivamente. Un Indice di Avidità (AI) <0.80 identifica le infezioni precoci da HIV (entro 6 mesi).

Abbiamo valutato se il trattamento precoce delle infezioni HIV-1 acute (AHI) con la terapia antiretrovirale altamente attiva (HAART) influenzi la maturazione anticorpale, misurata attraverso l'AI.

Metodi. Abbiamo identificato retrospettivamente tredici individui con AHI sintomatica, dei quali erano disponibili campioni di siero o plasma alla presentazione e a 3, 6 e 12 mesi. Otto soggetti hanno iniziato HAART al momento della diagnosi (intervallo 0-46 giorni dopo la presentazione); tra questi, quattro hanno sospeso la terapia almeno dopo un anno, uno di loro l'ha ripresa dopo 19 mesi. Cinque soggetti non sono stati mai trattati durante il periodo in esame. L'AI è stato calcolato con un saggio immunoenzimatico anti-HIV automatizzato.

Risultati. Alla presentazione, la viremia variava da 0.003 a 38 x 10⁶ RNA copie/ml. Nei pazienti trattati, è stata osservata una completa soppressione della viremia per tutto il periodo di osservazione, mentre nei non trattati la viremia raggiungeva il setpoint in 4-6 mesi. Alla presentazione, l'AI era molto simile nel gruppo dei pazienti che è poi stato trattato rispetto a quello rimasto senza trattamento (AI mediana 0.40 vs 0.42). A 3, 6 e 12 mesi, l'AI mediana era 0.42, 0.49, 0.54 nei soggetti trattati, e 0.75, 0.89, 0.97 nei non trattati. Dopo la sospensione della terapia, l'AI aumentava progressivamente, superando in tutti il cutoff di 0.80 in 6 mesi.

Conclusioni. L'HAART precoce, accompagnata da una rapida soppressione del virus, ostacola l'aumento graduale dell'AI. Questo alterato pattern di maturazione della risposta anticorpale nei pazienti che raggiungono un rapido controllo della replicazione virale suggerisce un complesso meccanismo di risposta immunitaria da approfondire ulteriormente.

122

PREVALENZA DI INFEZIONE DA CMV, EBV E HHV8 NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI

¹Costa C., ¹Bergallo M., ²Lavagna A., ²Daperno M.,
¹Sidoti F., ²Pera A., ¹Cavallo R.

¹Dip. di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U. Virologia,
Università di Torino;

²Divisione di Gastroenterologia, A.S.O. Ordine Mauriziano, Torino

Introduzione. L'eziologia delle malattie infiammatorie intestinali (IBD) - m. di Crohn (CD) e rettocolite ulcerosa (UC) - è tuttora sconosciuta. Recentemente è stato ipotizzato il ruolo delle infezioni virali, in particolare da Herpesviridae, nello sviluppo e nel decorso delle IBD. L'infezione da CMV non riconosciuta e non trattata risulta significativamente associata a refrattarietà alla terapia steroidea nell'UC. EBV sembra coinvolto nella patogenesi di una parte dei linfomi non-Hodgkin che si sviluppano nei pazienti con IBD, mentre non sembra significativamente associato allo sviluppo di K rettocolico. Secondo altri autori, invece, EBV e CMV a livello intestinale non rivestirebbero alcun ruolo e sarebbero solo "spettatori innocenti". Non sono tuttora stati effettuati studi sulla prevalenza di infezione da HHV-8 nelle IBD.

Scopo. Indagare in modo prospettico la prevalenza di infezione da CMV, EBV e HHV-8 nelle biopsie coliche e nel sangue di pazienti con IBD in fase attiva.

Materiali e metodi. Sono stati reclutati 18 pazienti consecutivi con IBD in fase attiva (11 CD, 7 UC) sottoposti a colonoscopia. Sono stati prelevati in contemporanea campioni biotici di mucosa colica nelle aree di infiammazione attiva e campioni ematici. E' stata effettuata l'estrazione di DNA e RNA ed i geni di CMV, EBV e HHV-8 sono stati ricercati mediante PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR). I risultati sono stati correlati con dati clinici, ematochimici e grado di attività di malattia endoscopica (EDA).

Risultati. La QC-PCR per CMV era positiva in 2 campioni biotici (1 CD, 1 UC; 11%) e 1 ematico (6%) di un terzo paziente con CD. La QC-PCR per EBV era positiva in 10 campioni biotici (5 CD, 5 UC; 56%, in 3 casi con alta carica virale) e 0 campioni ematici. HHV-8 era negativo in tutti i campioni. Dati clinici, ematochimici ed EDA non differivano significativamente tra casi positivi e negativi.

Conclusioni. La localizzazione colica di EBV è frequente sia nella CD sia nell'UC, ma non sembra associata ad infezione sistemica. Il riscontro di CMV sia a livello colico sia ematico è inferiore a quanto precedentemente riportato. Nessuno dei due virus sembra coinvolto nella patogenesi delle complicanze delle IBD, sebbene siano necessari ulteriori studi di follow-up a lungo termine e su una popolazione più ampia. Come atteso, HHV-8 non è stato rilevato in questi pazienti.

123

CARATTERIZZAZIONE DELLA RISPOSTA ANTICORPALE EBV SPECIFICA IN PAZIENTI CON CARCINOMA NASOFARINGEO INDIFFERENZIATO (UCNT)

Pin E., Crepaldi C., D'Andrea M., Marus A., Bortolin M.T.,
Pratesi C., Zanussi S., [^]Bidoli E., Tedeschi R., De Paoli P.

S.O.C. di Microbiologia-Immunologia e Virologia,

[^]Epidemiologia, Centro di Riferimento Oncologico, IRCCS,

Via Pedemontana Occidentale, 12-33081 - Aviano (PN) - Italy

Introduzione. UCNT è un tumore maligno endemico nel Sud-Est Asiatico e raro in Occidente, strettamente correlato con EBV e l'utilizzo di marcatori sierologici EBV specifici rappresenta un utile strumento nell'approccio diagnostico. Questo studio valuta la performance analitica di dosaggi sierologici basati su antigeni virali litici e latenti, allo scopo di studiare la reattività anticorpale e definire nuovi marcatori nella diagnosi UCNT in una popolazione dove la patologia non è endemica.

Metodi. Settantotto pz UCNT, provenienti da tutta Italia, seguiti dall'Oncologia dell'Istituto, sono stati studiati al tempo pre-terapia. È stata valutata la reattività anticorpale IgA anti EA+EBNA1 mediante ELISA (Bio-check), IgG e IgA verso ZEBRA mediante ELISA basato su peptide sintetico corrispondente all'epitopo immunodominante; la risposta immunitaria verso LMP-1 è stata valutata con metodica western-blot basata su estratto proteico da linea cellulare BJA-B. In tutti i pz è stata eseguita, di routine, la sierologia IgG EBNA ed EA, IgM VCA (ELISA, Biotest) e la viremia sierica EBV (Real-Time TaqMan PCR).

Risultati. Buona sensibilità riscontrata verso i nuovi marcatori EBV, con una sieroreattività per LMP1 pari a 38% (IgG) e 32% (IgA); nessun pz ha evidenziato IgA ZEBRA mentre 61% era IgG positivo. Sensibilità (68%) e specificità (88%) IgA EBNA1+EA nella nostra casistica sono state valutate mediante curva ROC. La combinazione di più marcatori aumenta la sensibilità: EA+EBNA-1 IgA con LMP-1 IgG (95%), con ZEBRA IgG (95%), con EBV DNA (95%) o con LMP-1 IgA (92%), o LMP-1 IgG con ZEBRA IgG (72%). Infine, le positività sierologiche EA e ZEBRA assieme alla quantificazione di EBV DNA suggeriscono una probabile riattivazione virale.

Conclusioni.

- 1) Possibile ruolo di LMP1 come marcatore nella diagnosi e follow-up di pz UCNT;
- 2) Valutazione IgA utile in pz a rischio UCNT o con diagnosi clinica difficile;
- 3) La combinazione di dosaggi sierologici e molecolari offre una valutazione laboratoristica completa e utile a supportare la clinica UCNT.

124

PREVALENZA DI HDV IN UNA POPOLAZIONE CALABRESE DI PORTATORI CRONICI DI HBsAg

Tenuta R., Greco F., Noto A., Palermo M., Perugini D., Savino O., Giraldo C.

Virologia Ospedale, Annunziata AO Cosenza

Introduzione. Radjef ipotizza che nel mondo siano coinfectate con HDV circa 20.000.000 persone, partendo dal presupposto che a livello mondiale, sono presenti 460.000.000 persone affette da infezione cronica HBV correlata; scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la prevalenza di HDV in una popolazione calabrese di portatori cronici di HBsAg.

Materiali e Metodi. E' stata determinata la presenza di IgG e IgM anti HDV in 215 campioni, provenienti dalla nostra banca di campioni e riferiti esclusivamente al periodo gennaio-dicembre 2005, tutti appartenenti ad una popolazione HBsAg positiva. Il 32% di questi campioni, proveniva da pazienti con epatite cronica HBV correlata; il restante di questi apparteneva a soggetti apparentemente sani. Su tutti i 215 campioni, sono stati eseguiti: AST, ALT, HBsAg, HBe Ab/Ag, HBcAb (Abbott), IgG e IgM anti HDV (Sorin), HBVDNA quantitativo (Real Time ROCHE e/o bDNA Bayer).

Risultati. I campioni esaminati, provenivano per il 32% da pazienti con epatite cronica HBeAb positiva, ipertransaminemia e con HBVDNAemia, il restante 68% dei soggetti presentano transaminasi nella norma e HBVDNAemia positiva/negativa. Su tutti i campioni abbiamo riscontrato i seguenti pattern: n. 5 campioni IgG anti-HDV positivi e IgM anti-HDV negativi e n.10 campioni IgG e IgM anti-HDV positivi. La prevalenza nella nostra popolazione, di portatori cronici di HBsAg risulta essere pari al 7%.

Conclusioni. Nel 2006, nonostante la vaccinazione obbligatoria nei confronti di HBV, la prevalenza nella nostra regione dell'infezione da HBV risulta essere ancora alta, con circolazione del virus delta, pari al 7%, soprattutto nelle popolazioni a rischio.

125

GENOTIPIZZAZIONE DI HCV: CONFRONTO TRA UN NUOVO TEST IN REAL-TIME PCR E UN TEST DI IBRIDAZIONE SU FASE SOLIDA

Rossi A.¹, Bassani A.¹, Berrone A.¹, Baj A.¹, Pulvirenti F.R.², Toniolo A.Q.¹

¹Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Università dell'Insubria e Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese;

²Abbott Molecular, Roma

Introduzione. La genotipizzazione di HCV è utile a prevedere la risposta alla terapia, modulare la durata del trattamento e formulare vaccini protettivi. A scopo clinico è sufficiente determinare il tipo virale. E' anche interessante distinguere i sottotipi 1a e 1b per i possibili riflessi sulla progressione e gravità della malattia. L'ibridazione su membrana dei

prodotti di amplificazione è il metodo diagnostico più diffuso (LiPA HCV, Bayer). Abbiamo confrontato con il LiPA HCV test un nuovo metodo di tipizzazione in real-time PCR (HCV Genotyping ASR, Abbott-Celera) che, partendo da RNA estratto in maniera manuale o automatizzata, identifica i genotipi virali 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4 e 5 mediante tre reazioni multiplex che utilizzano sonde TaqMan. Il test riconosce due regioni genomiche: NS5 per discriminare i sottotipi 1a e 1b e 5'UTR per gli altri tipi e sottotipi.

Metodi. Si sono analizzati campioni di siero di 72 pazienti con infezione cronica da HCV conservati a -70°C.

Risultati. Il metodo real time PCR ha assegnato il tipo/sottotipo in 71 dei 72 campioni (1 indeterminato). La concordanza di tipo è risultata del 98,6%. Il campione discordante è risultato di tipo 4 con il metodo in real-time PCR e di tipo 1 con il metodo LiPA. Su 16 campioni identificati come tipo 1 dal LiPA, la real-time PCR ha assegnato anche il sottotipo (1a, 14 campioni; 1b, 2 campioni). Cinque campioni sono risultati discordanti per il sottotipo (1a, real-time PCR; 1b, LiPA). Un campione con infezione mista (1+4) è stato identificato da entrambi i metodi.

Conclusioni. La real time PCR ha mostrato alta concordanza con il test LiPA per l'identificazione del tipo virale. Il target NS5 appare affidabile per distinguere i sottotipi 1a e 1b. Il metodo sembra anche capace di identificare le infezioni miste.

126

VALUTAZIONE DI UN SISTEMA IN PCR REAL-TIME APPLICATO ALLO SCREENING TRASFUSIONALE PER HCV, HIV-1/HIV-2 E HBV

Ursitti A., Schiavone M.L., De Angelis A., Luciani A.R., Panecaldo I., Spanò A.

Servizio di Microbiologia, Virologia, Immunologia Ospedale S. Pertini ASL RMB - Centro di riferimento per la Sicurezza Trasfusionale della Regione Lazio.

Premessa. Scopo del lavoro è stato quello di valutare le prestazioni di un sistema automatico di screening per HCV, HBV, e HIV attraverso tecnologia degli acidi nucleici (NAT) relativamente ai parametri di sensibilità, specificità, accuratezza diagnostica e caratteristiche d'impiego della nuova piattaforma analitica rispetto alla strumentazione in uso presso il nostro centro.

Metodi. Il sistema valutato è il Cobas s201 (Roche Molecular System, Branchburg, NJ,US), costituito da un modulo per l'esecuzione del pooling (Hamilton Microlab STAR), dalla componente per l'estrazione degli acidi nucleici (Cobas AmpliPrep), e dall'analizzatore (Cobas TaqMan) per l'amplificazione/rivelazione con tecnologia PCR Real-time. I reattivi TaqScreen multiplex utilizzati consentono la rivelazione contemporanea di 5 analiti: HCV, HIV-1 gruppo M, HIV-1 gruppo O, HIV-2 ed HBV. Sono state effettuate le seguenti valutazioni: 1. qualifica dell'operatore, utilizzando 4 pannelli Acrometrix da 6 membri (11 positivi e 13 negativi); 2. riproducibilità, impiegando 4 pannelli Acrometrix da 6 membri (20 positivi e 4 negativi); 3. sensibilità, attraverso diluizioni a differenti concentrazioni allestite da 3 standard WHO HCV, HBV e HIV-1; 4. studio dei donatori, effettuato su 2018 donazioni random, in minipool costituiti da 6 campioni (le stesse dona-

zioni sono state testate in parallelo e simultaneamente con il sistema in uso Cobas Ampliscreen Roche).

Risultati. I risultati dei pannelli Acrometrix utilizzati per la qualifica dell'operatore e per lo studio di riproducibilità sono stati quelli attesi. I valori soglia 95% per i tre marcatori virologici sono stati i seguenti: HCV 9.2 UI/mL (7.1-13.5) HBV 1.5 UI/mL (1.2-2.5) HIV-1 53.2 UI/mL (30.1-132.1). Su tutti i donatori è stata osservata assoluta corrispondenza tra i due sistemi analitici, concordanti con i risultati dei test sierologici di screening.

Discussione. La nuova piattaforma analitica s201 presenta una elevata sensibilità, specificità, riproducibilità, robustezza e totale automazione. La semplicità di esecuzione, l'elevata processività analitica e la standardizzazione di tutte le fasi analitiche, si ripercuotono favorevolmente sull'organizzazione del lavoro e sulla gestione delle risorse umane.

127

EPIDEMIOLOGIA E ANTIBIOTICO RESISTENZA: COLLOQUIO TRA IL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E I MEDICI DI MEDICINA GENERALE VIA INTERNET

Casari E., Ferrario A., Lagioia M.¹, Montanelli A.

Unità di Microbiologia, ¹Direzione Medico Sanitaria
IRCCS Istituto Clinico Humanitas, via Manzoni 56,
20089 Rozzano (Milano)

La riduzione dei giorni di degenza dei pazienti nelle strutture sanitarie (dimissioni precoci) carica sul medico di base la gestione di complicità infettivologiche che una volta erano di pura pertinenza del medico ospedaliero.

I dati epidemiologici di chemioantibiotico resistenza dei ceppi batterici provenienti dai pazienti ambulatoriali mostrano di fatto lo svilupparsi di "particolari resistenze". In virtù di queste modificazioni del panorama infettivologico abbiamo pensato di mettere a disposizione del medico di base, attraverso Internet ed in particolare nel sito dell'Istituto, i dati epidemiologici del nostro territorio insieme ad alcuni suggerimenti operativi.

In particolare: i microrganismi riscontrati con una significativa frequenza, la posologia e le modalità di somministrazione degli antimicrobici in base alla loro disponibilità nell'antibiogramma ed inoltre il profilo di chemioantibiotico resistenza per i germi riscontrati con maggiore frequenza nei distretti urinario e faringeo.

Inoltre si è pensato di attivare una casella di posta elettronica per facilitare un dialogo su quesiti specifici fra il medico di medicina generale e lo specialista infettivologo. Con una cadenza semestrale i dati epidemiologici vengono esportati dal programma di gestione dei dati microbiologici Epicenter (Becton Dickinson, Biosciences, Sparks, Md.) e immessi direttamente nel sito in modo da rendere automatico l'aggiornamento.

La veste iconografica scelta è stata un grafico a torta per quanto riguarda la frequenza dei microrganismi isolati nelle urine e un istogramma a barre per le percentuali di sensibilità dei batteri agli antimicrobici.

In dettaglio: i microrganismi isolati nelle urine nei primi 5 mesi del 2006 dei pazienti ambulatoriali sono stati in totale 530 di cui nel 54.5 % dei casi si trattava di

Escherichia coli, nel 7,9 % Streptococcus agalactiae, nel 7,7 % Proteus mirabilis, nel 4,7 % Enterococcus faecalis e nel 4,7 % Klebsiella pneumoniae. I restanti microrganismi sono stati riscontrati in una percentuale inferiore al 2%.

L'Escherichia coli è risultata sensibile all'acido nalidixico nell'80% dei casi, alla levofloxacina nell'85%, alla nitrofurantoina nel 99%, alla norfloxacina nell'85% ed al trimetoprim-sulfametossazolo nel 75%.

Per quanto riguarda gli isolamenti del distretto faringeo i 38 ceppi di Streptococcus pyogenes sono risultati resistenti all'eritromicina nel 30% dei casi.

128

UTILIZZO DI TABELLE STANDARD NELLA GESTIONE DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA

Rizzo C., Dell'Aquila L., Ceci G., Battista M.,
De Pascale G., Coscia MF., Monno R., De Vito D., Rizzo G.

U.O. Igiene Epidemiologia Sanità Pubblica I,
P.zza G. Cesare 11 - 70124, Bari.

Introduzione. L'U.O. Igiene Epidemiologia Sanità Pubblica I, dell'A.O. Policlinico Bari dovendo installare un nuovo sistema gestionale del laboratorio di microbiologia ha voluto testare l'utilizzo delle tabelle standard proposte dal gruppo di lavoro del progetto Micronet promosso dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'AMCLI. L'uso di tabelle standard per la gestione del laboratorio di microbiologia rappresenta quindi una opportunità per la creazione di network regionali basati sui laboratori di microbiologia finalizzati alla raccolta e confronto dei dati a livello regionale che nazionale.

Metodi. Sono state utilizzate le tabelle Micronet nella versione 07. Sebbene esse siano ancora in una fase di sviluppo e in fase di test anche per l'esportazione dei dati, esse sono state utilizzate come base per la configurazione del software gestionale DNLab (Italnoema, Roma) installato presso il Policlinico di Bari nel Giugno 2006. Sono stati misurati gli indicatori per la valutazione (accettabilità e funzionalità e flessibilità) del sistema gestionale attraverso un questionario, con scala di Lickert, somministrato all'inizio e dopo 30gg dall'installazione del sistema al personale del laboratorio (medico, biologo e tecnici di laboratorio).

Al laboratorio afferiscono ogni mese circa 3.500 richieste, provenienti sia dalla ASL Ba/4 (500.000 assistiti) che dai 1.100 posti letto dell'Azienda Ospedaliera.

Risultati. I questionari sono stati distribuiti ad un totale di 17 persone (9 tra medici e biologi e 8 tecnici di laboratorio). L'accettabilità al tempo 0 riguardo il cambiamento del sistema gestionale verso un sistema che utilizza tabelle standard è risultata buona per tutti gli indicatori valutati. Sono in corso di analisi i questionari del follow-up a 30 gg.

Conclusioni. Tale indagine permette riflessioni sull'uso di tabelle standard mirate soprattutto alla condivisione e trasmissione di dati di microbiologia ma che si prestano anche agli aspetti organizzativi e gestionali quotidiani del laboratorio stesso.

129

INCIDENZA DI TOSSINA A DI *C. DIFFICILE* NELLE FECI DI OSPITI DEGENTI IN ISTITUTI GERIATRICI

Frugoni S.¹, Berlusconi A.¹, Balzaretto M.², D'Angelo R.², Flamminio G.³, Magliano E.⁴

¹ASP I.M.MeS. e P.A.T., Servizio di Medicina di Laboratorio, Via Trivulzio 15, 20146 Milano.

²ASP Golgi-Redaelli, Servizio di Medicina di Laboratorio, Via B.D'Alviano 78, 20146 Milano

³Servizio di Microbiologia e Virologia Spedali Civili di Brescia, P.zza Spedali Civili 1, 25100 Brescia.

⁴Direttore Scientifico Associazione Microbiologi Clinici Italiani.

Introduzione. *Clostridium difficile* è un microrganismo anaerobio sporigeno gram positivo presente nella normale flora intestinale dell'uomo senza causare malattia.

Caratteristica è la produzione di due tossine (A e B) con effetti citotossici a carico dei tessuti dell'epitelio intestinale con conseguente secrezione di fluido nel lume e diarrea clinicamente evidente. Forma grave dell'infezione è la colite pseudomembranosa. *C.difficile* è la principale causa di diarrea infettiva in ambito nosocomiale. Nei pazienti istituzionalizzati di età superiore ai 60 anni aumenta il rischio di acquisizione dell'infezione in relazione alle modifiche della flora fecale, alla pressione selettiva degli antibiotici, all'esposizione all'ambiente ospedaliero ed alle patologie concomitanti. Scopo del nostro lavoro è stato quello di determinare l'incidenza dell'infezione in ospiti degenti presso due Aziende di Servizi alla Persona di Milano tra la popolazione dell'area riabilitativa (IDR) e quella residente (RSA).

Metodi. La ricerca della tossina A è stata eseguita con sistemi rapidi dagli SmeL dell'ASP Pio Albergo Trivulzio (Triage *C.difficile* panel BIOSITE) e dell'ASP Golgi-Redaelli (Toxin A OXOID) nel periodo giugno '05 - maggio '06 su campioni di feci fresche.

Risultati. Sono stati esaminati 1166 campioni, provenienti da 759 pazienti. Di questi, 1001 provenivano da IDR e 165 da RSA. I campioni risultati positivi per la presenza di tossina A sono stati 262 (26%) in IDR e 36 (21.8%) in RSA. La differenza tra le due percentuali non è statisticamente significativa (χ^2).

Conclusioni. Da questi dati risulta evidente che nelle nostre ASP il numero di richieste per la ricerca della tossina A di *C.difficile* è maggiore in IDR. Il maggior sospetto clinico non è però correlato con una maggiore incidenza di infezione da ceppi produttori di tossina A. Il dato è spiegato probabilmente dalle caratteristiche del paziente ricoverato in RSA (frequenti ospedalizzazioni per eventi acuti, frequenti terapie antibiotiche, instabilità clinica, polipatologia, fragilità).

130

EZIOLOGIA DELLE BATTERIEMIE NEGLI ANNI 2000-2005 PRESSO L'AZIENDA OSPEDALIERA SAN PAOLO DI MILANO

Cainarca M., Battaglioli L., Baccalini R., Tarricone C., Galliani C., Grimaldi C., Melzi d'Eril G.V.*

*Dipartimento di Medicina Chirurgia e Odontoiatria Università di Milano

U.O. Laboratorio di Analisi, Azienda Ospedaliera San Paolo, Via di Rudinì 8, 20142 Milano.

Introduzione. Nell'arco di sei anni è stato valutato l'andamento della eziologia delle batteriemie per i pazienti ricoverati con una degenza superiore ad un giorno, definendo come batteriemia significativa la presenza di un germe certamente patogeno e, per i possibili contaminanti, la presenza dello stesso in almeno due emocolture; si considerano inoltre come unico episodio infettivo tutte le emocolture positive nell'arco di sette giorni per uno stesso paziente.

Materiali e metodi. Raccolta retrospettiva delle batteriemie positive monomicrobiche e polimicrobiche eseguite negli anni 2000-2005. Tutti i ceppi sono stati identificati con lo strumento Vitek2 (bioMérieux).

Risultati. Il numero totale degli isolati nel corso dei sei anni non risulta significativamente variato (133 nel 2000, 142 nel 2001, 152 nel 2002, 128 nel 2004, 133 nel 2005) tranne che per l'anno 2003 (102). Proprio nel 2003, si nota una diminuzione di circa un terzo del totale delle emocolture positive con un calo di isolamenti sia per Gram negativi (40) sia per Gram positivi (53). Tra gli isolati, la diminuzione più significativa si registra per *Enterococcus* spp (6 nel 2003) e per *Pseudomonas aeruginosa* (6 nel 2003). Nel 2000 per *Enterococcus* spp sono stati contati rispettivamente 10 isolamenti vs 15, 16, 12 e 14. Nel 2000 per *Pseudomonas aeruginosa* isoliamo 6 ceppi vs 15, 11, 24 e 6. Un'altra differenza significativa risulta in un brusco aumento delle emocolture positive per anaerobi nel 2002 (12 versus 9, 5, 3, 4 negli altri anni) pur essendo rimaste invariate le metodologie colturali ed identificative. Complessivamente abbiamo riscontrato che il primo germe come frequenza su un totale di ceppi isolati di 790 è lo *S. aureus* (21.1%) seguito da *E. coli* (20.5%), enterococchi (9.2%), SCN (8.35%), gruppo KES (6.8%). Separando le batteriemie nosocomiali da quelle comunitarie, è stato evidenziato che *E. coli* è responsabile del 23% delle comunitarie e del 16.5% delle nosocomiali, mentre lo *S. aureus* interessa il 19.6% delle comunitarie ma sale al 23.2% per le nosocomiali. L'enterococco è responsabile invece del 13% delle batteriemie nosocomiali e del 6.4% di quelle comunitarie, lo SCN del 12.5% delle nosocomiali e del 5.3% delle comunitarie, mentre il gruppo KES interessa il 7% delle nosocomiali e il 7.1% delle comunitarie.

Conclusioni. In accordo con molti dati della letteratura si evidenzia il ruolo dello *S. aureus* come maggior responsabile delle batteriemie nosocomiali, mentre ancora una volta si rileva che le batteriemie da *Salmonella* spp. sono solo comunitarie.

131

EPIDEMIOLOGIA DELLE BATTERIEMIE NEGLI ANNI 2000-2005 PRESSO L'AZIENDA OSPEDALIERA SAN PAOLO DI MILANO

Cainarca M., Battaglioli L., Baccalini R., Tarricone C.,
Galliani C., Grimaldi C., Melzi d'Eril G.V.*

*Dipartimento di Medicina Chirurgia e Odontoiatria
Università di Milano
U.O. Laboratorio di Analisi, Azienda Ospedaliera San Paolo,
Via di Rudini 8, 20142 Milano.

Introduzione. Negli ospedali è in aumento il numero dei pazienti a rischio di infezione del sangue a causa dell'incremento delle metodologie invasive, principali fattori di sepsi. L'emocultura è da sempre considerata l'esame più rilevante e specifico per il corretto trattamento del paziente a rischio di batteriemia.

Nonostante l'introduzione di strumenti semiautomatici per l'incubazione e la lettura, con riduzione nei tempi della risposta, la diffusione dell'emocultura in Italia è ancora inferiore rispetto a quella degli altri Paesi europei. Scopo del nostro lavoro è quindi di stimolare con l'evidenza dei dati l'interesse dei clinici, portandoli a conoscenza, pure a posteriori, dell'epidemiologia e dell'eziologia delle emocolture da loro effettuate.

Materiali e metodi. Raccolta retrospettiva degli episodi infettivi, delle batteriemie significative, delle pseudobatteriemi rilevate negli anni 2000-2005, rapportando i singoli dati ad ogni mille ricoveri, in modo da avere dei tassi confrontabili negli anni sia all'interno del nostro ospedale sia con altre realtà ospedaliere.

Risultati. Nei sei anni presi in considerazione non abbiamo notato un aumento dei prelievi per singolo episodio infettivo: il "trend" è rimasto costante con una media di 2.16. Nei sei anni la media percentuale delle batteriemie significative per episodio infettivo è stata del 14%. Di fatto, il "trend" appare diverso se si considerano i reparti di medicina e di chirurgia. Infatti nei reparti di chirurgia la media è superiore (18.7%) rispetto a quella dei reparti di medicina (15.7%), come da letteratura, probabilmente per il fatto che il chirurgo ricorre all'emocultura solo in presenza di forti sospetti di sepsi. L'andamento della percentuale delle pseudobatteriemi per episodio infettivo non ha subito variazioni sostanziali (6.4%). Sottolineiamo inoltre che nell'arco dei sei anni la percentuale delle batteriemie nosocomiali non sia variata sostanzialmente e che la media su mille ricoveri è di 2.76 mentre la media per le batteriemie comunitarie, sempre per mille ricoveri, è di 4.08.

Conclusioni. Sulla base dei risultati ottenuti laboratorio ci si propone di organizzare corsi di aggiornamento al personale infermieristico per ribadire l'importanza dell'esecuzione di un prelievo corretto, di almeno tre emocolture ogni qualvolta si sospetti un episodio infettivo, sia per avere maggior possibilità di isolamento del germe anche nel caso di batteriemie transitorie, sia per avere certezza di sepsi in caso di isolamento di germi non certamente patogeni.

132

IN ATTESA DEL VACCINO: DIFFICOLTÀ NELLA SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI NOSOCOMIALI DA ROTAVIRUS ALL'OSPEDALE DI DESIO

Cappellani A., Solaro M., Colombo L., Mauri S.*, Mocarelli P.

Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio;
*Ufficio Infermieristico; Ospedale di Desio,
via Mazzini 1, 20033 Desio (MI)

Introduzione. Le infezioni da Rotavirus rappresentano una delle principali cause di diarrea pediatrica in ambito ospedaliero.

Tale virus, la cui diffusione ha andamento stagionale con picco nei mesi invernali, comporta la riduzione temporanea della qualità di vita del bambino e un prolungamento della degenza ospedaliera.

In attesa del nuovo vaccino (probabilmente disponibile in Italia nel dicembre '06), è opportuno seguire le norme igieniche di prevenzione dell'infezione.

Scopo del nostro lavoro è stato valutare l'andamento delle infezioni nosocomiali da Rotavirus (RV-NOSO) nel reparto di Pediatria dell'Ospedale di Desio nel periodo ottobre '04 - marzo '06.

Metodi. I campioni fecali di bambini con sospetta infezione da Rotavirus, inviati al laboratorio dell'Ospedale di Desio, sono stati analizzati mediante RidaQuick-Rotavirus(PROMESAN) fino a maggio '05 e CerTest-Rota-Tube(BIOTEC) successivamente. Sono state considerate probabili RV-NOSO le infezioni manifestatesi dopo 72 ore di degenza e con diagnosi d'ingresso diversa da gastroenterite acuta. Sono state calcolate:

- 1) percentuale di RV-NOSO sul totale delle infezioni da Rotavirus (ROTA+);
- 2) prevalenza di ROTA+ ($N^{\circ} \text{ROTA+} / N^{\circ} \text{pazienti dimessi} \%$);
- 3) prevalenza di casi nosocomiali ($N^{\circ} \text{RV-NOSO} / N^{\circ} \text{pazienti dimessi} \%$).

Risultati. Nel periodo considerato sono stati analizzati per Rotavirus i campioni fecali di 709 bambini, 243 dei quali sono risultati positivi.

Di questi, 185 sono stati diagnosticati ROTA+ entro 72 ore, 8 dopo oltre 72 ore ma con diagnosi d'ingresso di gastroenterite acuta; 50 (20,6%) sono stati considerati RV-NOSO.

Nel 2005 la prevalenza di ROTA+ ha raggiunto l'apice in aprile (15,2%;24/158), nel 2006 in febbraio (26,7%;24/90). Le massime prevalenze di RV-NOSO sono state raggiunte rispettivamente nel febbraio '05 (4,8%;7/146) e nel febbraio '06 (5,6%;5/90).

Conclusioni. Nonostante la messa in atto di norme preventive (istruzioni a personale di reparto e parenti sul lavaggio delle mani, frequente pulizia dei bagni, limitata circolazione di genitori e bambini), l'alto numero dei ricoveri di soggetti già affetti da Rotavirus nel 2006 ha provocato un conseguente aumento di RV-NOSO rispetto al 2005.

133

ENDOCARDITE DA KYTOCOCCUS: UN PATOGENO EMERGENTE ?

D'Andria A., Cinquanta L., Avallone L., Greco L.,
Marino S., Massari A.

Servizio di Medicina di Laboratorio

* Malattie Infettive

Azienda Ospedaliera "S. Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona"
- Salerno

Introduzione. I cocchi Gram positivi del genere *Kytococcus*, comprendenti le due specie *K. sedentarius* e *K. schroeteri*, si distinguono dal genere *Micrococcus*. per la presenza d'attività arginina deidrolasi e la resistenza a oxacillina, meticillina, penicillina. In letteratura vengono riportati a tutt'oggi due casi di endocardite da *K. schroeteri* in pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca.

Caso clinico. Maschio di 38 anni perviene alla nostra osservazione per una storia di 4 mesi di febbre persistente dopo intervento di Bentall presso altro nosocomio.

Dopo ricovero gli vengono praticate le abituali indagini di laboratorio che evidenziano incremento degli indici di flogosi ed è sottoposto ad emocolture seriate.

L'ecocardiografia transesofagea è suggestiva per endocardite. Il paziente è sottoposto a nuovo intervento per la sostituzione delle protesi e il materiale rimosso posto in coltura. Dopo un mese di terapia il paziente, guarito, viene dimesso.

Materiali e metodi. Il monitoraggio delle colture è stato effettuato con sistema Bactec 9240 (BD).

Dalle colture positive sono stati allestiti Gram diretti e varie subcolture, delle quali sono risultate positive quelle su 5% Sheep Blood Agar.

I test biochimici sono stati eseguiti con i sistemi VITEK (card GPI) e API STAPH (bioMérieux).

Il profilo di farmacosensibilità è stato realizzato col metodo Kirby-Bauer.

Risultati. Tre emocolture e la coltura delle protesi sono risultate positive dopo 48 ore. Il batterioscopico rivela cocchi Gram positivi e la subcoltura mostra colonie bianco-giallastre di piccolo diametro prive di emolisi. Gli isolati sono strettamente aerobi, mostrano attività arginina deidrolasi e resistenza a oxacillina, meticillina, penicillina.

Conclusioni. L'isolamento in campioni biologici di cocchi Gram positivi con le caratteristiche biochimiche e di farmacoresistenza descritte consente di identificare il *K. schroeteri* come responsabile della endocardite rispetto ad altri opportunisti di più comune riscontro (stafilococchi e micrococchi).

Sono ancora poche le segnalazioni in letteratura che individuano il *K. schroeteri* quale patogeno emergente, un ruolo probabilmente ancora sottovalutato.

134

ACCERTAMENTO MOLECOLARE DELLA RELAZIONE CLONALE FRA ALCUNI ISOLATI DI *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Fontana C.^{1,2}, Favaro M.¹, Pistoia E.S.¹, Bossa M.C.²,
Altieri A.², Leonardis F.³, Natoli S.³, Testore G.P.⁴, C.Favalli^{1,2}.

¹Dipart. Medicina Sper e Sc. Biochimiche,

⁴Cattedra di Malattie Infettive - Università Tor Vergata

- Via Montepellier, 1 - 00133 Roma

²Lab Microbiologia,

³Terapia Intensiva, - Policlinico Tor Vergata - V.le Oxford 81

- 00133 Roma

Introduzione. Negli ultimi 30 anni l'interesse per l'*Acinetobacter* spp è costantemente aumentato. Due sono le principali ragioni: la pan-resistenza di questo microrganismo ed il fatto che è spesso responsabile di violenti focolai epidemici che coinvolgono più frequentemente i pazienti critici. Le circostanze a causa delle quali tale microrganismo, considerato come un patogeno di "low-grade" diventi un temuto avversario da fronteggiare non sono del tutto note. Probabilmente, la sua patogenesi è un fenomeno multifattoriale. I pazienti inizialmente colonizzati diventano infetti e non è un caso che le infezioni più frequenti siano quelle del torrente circolatorio e quelle polmonari. Il processo di colonizzazione iniziale è certamente influenzato dal grado di manipolazione dei vari devices impiantati sul paziente e questo rende ragione del fatto che questo patogeno sia più frequente nei reparti di terapia intensiva. Sono, infatti, degli importanti fattori di rischio per l'infezione da *A.baumannii*: le manovre invasive, l'esposizione a terapie con antibiotici a largo spettro, la durata della permanenza in ospedale ed in particolare nei reparti critici come le unità di terapia intensiva (TI). In questo contesto assume particolare rilevanza la sorveglianza epidemiologica degli isolati, soprattutto nelle aree critiche, al fine di prevenire o contenere pericolosi outbreaks.

Metodi. Scopo di questo lavoro è stato quello di illustrare come la combinazione di un software di controllo delle Infezioni Nosocomiali, in uso presso il laboratorio di microbiologia, in combinazione con i sofisticati sistemi di caratterizzazione molecolare (quale il Diversilab; Bacterial Barcodes Inc), siano stati di notevole aiuto nel controllo della diffusione dell'infezioni in TI. nel corso di un outbreak sostenuto da *A.baumannii*.

Risultati. L'episodio epidemico, che si è articolato in due eventi distanziati da un periodo di latenza di circa 3 mesi, ha visto coinvolti 16 isolati per un totale di 5 pazienti, in un primo momento, e 2 pazienti con un totale di due isolati in un periodo successivo. Gli isolati sono risultati clonalmente relati presentando una percentuale di somiglianza superiore al 98%.

Conclusioni. La rapida identificazione dell'outbreak e la corretta caratterizzazione degli isolati hanno portato alla tempestiva messa in opera di misure di contenimento che hanno impedito la diffusione del microrganismo ad altri pazienti del reparto o di altri reparti nello stesso ospedale in entrambi gli episodi. Ciò a dimostrazione di come un uso sinergico di programmi di controllo in combinazione a innovativi sistemi di caratterizzazione molecolare degli isolati siano efficaci nel contrastare lo spreading di temuti patogeni all'interno dei nosocomi.

135

STUDIO DELLA PREVALENZA DI CEPPI DI *E. COLI* E *KLEBSIELLA SPP* CON FENOTIPO ESBL DI RECENTE ISOLAMENTO CLINICO

Giordano A.*, Carattoli A.°, Gerardi S.*, Garcia A.°, Venditti M.°, Varesi P.*, Mancini C.*

°Istituto Superiore di Sanità V.le Regina Elena 299 00161

*Dip. Scienze di Sanità pubblica Ple A.Moro, 5 00185

^Dipartimento di Medicina Clinica V.le del Policlinico 155 00161 - Università di Roma "La Sapienza"

Introduzione. Lo sviluppo delle resistenze batteriche rappresenta una vera e propria emergenza sanitaria. Sappiamo che all'uso degli antibiotici i batteri rispondono acquisendo meccanismi di resistenza.

Per quanto riguarda i microrganismi gram-negativi le problematiche emergenti sono rappresentate dalla diffusione in alcune specie delle *Enterobacteriaceae* delle beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), enzimi in grado di idrolizzare le più potenti cefalosporine, ma sempre più spesso sono riportate anche carbapenemasi, enzimi con attività inattivante nei confronti dei carbapenemici, considerati farmaci di ultima risorsa nei confronti degli stipiti produttori di ESBL e dalla diffusione di stipiti di *Pseudomonas* multiresistenti. In Italia i dati più recenti stimano l'incidenza in ambito nosocomiale di ceppi produttori di ESBL intorno al 15-30%, con *Klebsiella*, *Proteus* ed *E.coli* le specie più coinvolte e oltre il 20% di *Pseudomonas aeruginosa* simultaneamente resistenti a beta-lattamici, fluorochinoloni e aminoglicosidi.

Metodi e risultati. In uno studio preliminare eseguito presso il laboratorio di Analisi Microbiologiche B dell'Azienda Policlinico Umberto I di Roma, sono stati isolati 276 ceppi tra *E. coli* e *Klebsiella* spp.. Su tali ceppi è stato eseguito uno screening iniziale con le card AST-N041 del sistema Vitek2 (BioMérieux). 10 *Klebsiella* spp. su 37 totali e 78 *E. coli* su 239 totali sono risultati essere ESBL positivi. Tali risultati sono stati confermati mediante metodo del doppio disco per diffusione in agar.

Lo studio verrà proseguito ricercando i geni più diffusi che codificano per ESBL e mediante genotipizzazione dei ceppi isolati.

136

IL PERCORSO DEL PAZIENTE DALL'OSPEDALE ALLA R.S.A.: IL PUNTO DI VISTA MICROBIOLOGICO

Gualdi P., Collini L., Schinella M., *Mariotti G., *Segata A.

Laboratorio Patologia Clinica,

*Direzione medica Ospedale S.Maria del Carmine - 38068 Rovereto (TN)

Scopo. Il monitoraggio ed il controllo del rischio infettivo nelle Residenze Sanitarie Assistite (R.S.A.) rappresenta una priorità nella sorveglianza di pazienti anziani, post-acuti e cronici, sottoposti a cicli ripetuti di ricoveri ospedalieri.

Lo scopo di questo studio è individuare il singolo paziente (anche portatore di batteri multi-resistenti) e poterlo seguire

nei vari ricoveri, siano essi in R.S.A. che in Ospedale.

Materiali e metodi. Sono stati presi in considerazione 5 pazienti "modello" in base ai loro spostamenti R.S.A.-Ospedale per poterne seguire, attraverso i loro campioni biologici, l'andamento dell'infezione e la persistenza o meno del germe in causa. Si tratta di pazienti con infezioni delle vie urinarie che al momento del ricovero sono stati ospitati prevalentemente nella U.O. di Geriatria.

Risultati. L'esperienza condotta nell'ambito della gestione epidemiologica dei 5 pazienti ha evidenziato che in alcuni casi il germe agente causale dell'infezione manteneva lo stesso profilo di sensibilità alle molecole antibiotiche saggiate, in altri casi acquisiva resistenze significative (es.: *P.mirabilis* divenuto ESBL). Ciò ha consentito non solo un monitoraggio dell'evoluzione dell'infezione, ma anche una rilevazione di profili di resistenza caratteristici di microrganismi sentinella.

Discussione e conclusioni. Dallo studio emergono situazioni in cui si sommano le diverse tipologie di infezioni contratte in reparti ospedalieri per acuti e quelle contratte in R.S.A., basate sulla tipologia di popolazione e delle cure (ad esempio la pressione selettiva degli antibiotici), sulla potenzialità di trasmissione crociata, sulle risorse assegnate, sulla disponibilità di personale medico ed infermieristico, sulle possibilità diagnostiche relative a strumenti e programmi di prevenzione e controllo.

I 5 soggetti ospiti di R.S.A. considerati in questo studio rappresentano casi concreti di quanto i batteri costituiscano un importante reservoir per successivi ricoveri ospedalieri e come possano trasferire resistenze "critiche" nel territorio.

137

EPIDEMIA DI PSEUDOBATTERIEMIE DA CONTAMINAZIONE DI FLACONI DI DISINFETTANTI-ANTISEPTICI

Leo L., D'Aversa P., Musio K., Lobreglio G.

A.O. "Pia Fondazione di Culto e Religione Card. G. Panico",

U.O. Med.Lab., Sez. Microbiologia, Via Pio X, 73039 Tricase (LE)

Introduzione. Una serie di emocolture positive per batteri saprofiti, in pazienti immunodepressi, ci ha spinto ad indagare sulle modalità di disinfezione adottate nei prelievi in un reparto del nostro Ospedale. In questo studio è stata valutata sia la sterilità dei flaconi di disinfettante aperti ed in uso in reparto, sia l'efficacia dei disinfettanti integri nei confronti dei batteri isolati dalle emocolture positive.

Metodi. È stata valutata la sterilità dei flaconi in uso di 4 soluzioni disinfettanti: Amuchina® (10% e 3%), clorexidina (1% e 3%), Baxidin® (cetrimide 15% e clorexidina diglucuronato 1,5%) e Braunol® (iodio-povidone 7,5%). Sono stati inoculati 100µl di ciascun disinfettante su piastra di Mueller Hinton Sangue 5% (48h., 35°C, CO₂ 5%), su Standard Method Agar (48h., 30°C) e 1ml in flaconi da emocoltura (BacT/alert 3D, bioMérieux). Allo stesso modo sono stati testati i flaconi integri di tutti i disinfettanti. Con i ceppi isolati dalle emocolture dei pazienti sono state preparate delle sospensioni (10⁶-10¹⁰ ufc/ml) in fisiologica, poi diluite con 9 parti di disinfettante integro. Dopo 5 min. sono stati seminati 100µl di ogni diluizione in piastra di Mueller Hinton Sangue 5% e Standard Method Agar.

Risultati. Dei 4 flaconi in uso di clorexidina al 1%, 3 erano

contaminati da *Achromobacter xylosoxidans* (Ax). Dei 7 flaconi di clorexidina al 3%, 3 erano contaminati da Ax e 1 da *Ralstonia paucula* (Rp). Dei 4 flaconi in uso di Baxidin®, 2 erano contaminati da Ax. Sono invece risultati tutti sterili i flaconi di Amuchina® e Braunol®. Nei successivi test Ax è cresciuto su agar sia dopo l'esposizione al Baxidin® che alla clorexidina 1% e 3%. Quest'ultima, a queste concentrazioni si è rivelata inefficace anche nei confronti di Rp.

Conclusioni. *Achromobacter xylosoxidans* e *Ralstonia paucula* appaiono resistenti ad alcuni disinfettanti di uso comune, tanto che in alcuni casi ne possono contaminare i flaconi.

138

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UNA EPIDEMIA DA *CANDIDA PARAPSILOSIS* IN TERAPIA INTENSIVA

Lo Cascio G.¹, Ligozzi M.², Maccacaro L.², Bertocelli A.², Fontana R.²

¹ Servizio di Microbiologia, Ospedale G.B. Rossi, Piazzale L.A. Scuro 10, Verona

² Dipartimento di Patologia, Sezione di Microbiologia, Strada Le Grazie 8, Verona

Introduzione. Le candidosi invasive sono un problema di crescente rilevanza nei reparti di terapia intensiva a causa dei numerosi fattori di rischio presenti in questi pazienti. Negli ultimi anni hanno assunto notevole importanza anche specie diverse da *Candida albicans* come *C. parapsilosis*. Scopo di questo studio è stato quello di indagare, con l'ausilio della biologia molecolare, una sospetta epidemia da *C. parapsilosis* verificatasi in un reparto di Rianimazione.

Materiali e metodi. Tutti ceppi di *C. parapsilosis* isolati dalle emocolture del reparto di Terapia Intensiva del Policlinico di Verona nel periodo compreso tra agosto 2005 ed aprile 2006 sono stati raccolti e indagati per evidenziarne la sospetta monoclonalità. L'estrazione del DNA del lievito è stata effettuata con un metodo automatizzato (easyMag-Biomérieux); successivamente il DNA è stato sottoposto ad una RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) utilizzando primer precedentemente descritti e ad una rep-PCR (ripetitive extragenic palindromic PCR). *C. parapsilosis* ATCC 22019 è stata utilizzata come controllo positivo.

Risultati. Sono stati isolati 10 ceppi di *C. parapsilosis*, identificate a livello di specie con metodi precedentemente descritti. I 10 ceppi appartenevano a 7 pazienti, 3 dei quali hanno presentato lo stesso isolato da emocoltura e da coltura del CVC. I profili ottenuti con la tipizzazione molecolare sono stati elaborati con il software Gel Compare (Applied Math) e hanno confermato l'origine clonale del ceppo di *C. parapsilosis* responsabile delle candidemie.

Conclusioni. Come descritto precedentemente *C. parapsilosis* risulta una specie emergente nell'ambito delle infezioni del sangue catetere-correlate. Questo studio retrospettivo, pur non avendo potuto stabilire la sorgente dell'infezione, ne ha evidenziato l'origine clonale. Si conferma ancora una volta l'utilità della sorveglianza epidemiologica in reparti a rischio, e l'utilità della tipizzazione molecolare nei sospetti eventi epidemici; sono necessari quindi ulteriori studi per standardizzare le tecniche molecolari per i miceti, ormai indispensabili nelle indagini epidemiologiche.

139

UTILIZZO DELLA PFGE PER LO STUDIO DI UN'EPIDEMIA DA *S. AUREUS* IN UN REPARTO DI PATOLOGIA NEONATALE

Pagani L.¹, Migliavacca R.¹, Matti C.², Perotti G.³, Nucleo E.¹, Spalla M.², Sacco L.², Daturi R.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;

³Divisione di Patologia Neonatale e Terapia Intensiva, IRCCS "S. Matteo", p.le Golgi, 27100 Pavia, Italia.

Introduzione. *Staphylococcus aureus* rappresenta una delle principali cause di infezioni gravi acquisite durante il periodo di degenza.

In Italia, si stima che circa il 35% degli *S. aureus* isolati in ambito ospedaliero risultino meticillino-resistenti. Preoccupanti profili di resistenza sono emersi, recentemente, anche per aminoglicosidi, tetracicline, fluorochinoloni nonché glicopeptidi. Scopo del presente studio è stato valutare i livelli di antibiotico-resistenza e le relazioni clonali fra ceppi di *S. aureus* isolati in un reparto di patologia neonatale.

Materiali e metodi. Durante il periodo Agosto 2005 - Marzo 2006, sono stati raccolti da differenti pazienti, ricoverati presso il reparto di Patologia Neonatale del Policlinico San Matteo di Pavia, 35 isolati di *S. aureus*. I microrganismi, identificati mediante i sistemi automatizzati Vitek System (Biomérieux, Roma) e BD Phoenix, sono stati sottoposti a test di sensibilità per cefoxitina, ampicillina, gentamicina, eritromicina, cotrimossazolo, ciprofloxacina, ed E-test per vancomicina e teicoplanina in terreno agarizzato seguendo le raccomandazioni del CLSI.

Le relazioni clonali fra gli isolati di *S. aureus* sono state stabilite attraverso PFGE (*SmaI*) (Bio-Rad).

Risultati. 31/35 campioni testati sono risultati sensibili a meticillina, cotrimossazolo, fluorochinoloni e glicopeptidi; resistenti invece ad ampicillina, tetraciclina eritromicina e gentamicina. 4/35 campioni sono risultati meticillino-resistenti. La resistenza era estesa anche a tetraciclina e gentamicina.

Gli studi di tipizzazione hanno evidenziato la diffusione epidemica di 2 cloni: A, comprendente i ceppi meticillino-sensibili e con fenotipo di resistenza ai macrolidi MLS_B inducibile, B tipico dei campioni meticillino-resistenti ed eritromicina sensibili.

Conclusioni. L'utilizzo dei metodi di tipizzazione è ritenuto auspicabile, soprattutto nei reparti ad alto rischio, per un pronto e sensibile rilievo di eventi epidemici nosocomiali, cosicché possano essere adottate tempestivamente efficaci misure di contenimento.

140

RIPETUTI CLUSTERS DA *S. MARCESCENS* IN UN REPARTO DI TERAPIA INTENSIVA NEONATALE: ASPETTI MICROBIOLOGICI E CLINICO-EPIDEMIOLOGICI

Pecorari M., Tamassia MG, Fabio G., Nanni N, Tagliazucchi S., Della Casa Muttini E*, Leporati G., La Regina A., Marchegiano P**, Scaltriti S**, Vecchi E**, Casolari C.

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

* Dipartimento Integrato Materno-Infantile, Sezione di Neonatologia, Policlinico, Modena;

** Direzione Sanitaria, Policlinico, Modena

Introduzione. *Serratia marcescens* è stata segnalata negli ultimi anni come causa di epidemie, talora difficili da eradicare, in reparti di terapia intensiva neonatale. Scopo della ricerca è la valutazione degli aspetti microbiologici e clinico-epidemiologici di ripetuti clusters di infezioni da *S. marcescens*, occorsi nel reparto di Neonatologia del Policlinico di Modena nell'arco di 3 anni.

Metodi. È stato condotto uno studio molecolare con RFLP-PCR su ceppi di *S. marcescens* isolati da campioni clinici di 55 neonati. Sono stati valutati i fattori di rischio e le misure di controllo intraprese.

Risultati. 38 bambini erano colonizzati e 17 affetti da infezioni di diversa gravità; di questi 6, prematuri di basso peso, hanno sviluppato setticemia ed uno è deceduto. La tipizzazione molecolare dei ceppi ha identificato 7 diversi genotipi (A-G) dei quali due prevalenti: A, 12 casi, e B, 27 casi. Complessivamente sono stati riscontrati 4 clusters di diversa entità: I, gennaio - aprile 2003, 9 casi, genotipo A; II, luglio 2003, 3 casi, genotipo B; III, gennaio - giugno 2004, 20 casi, genotipi C (8), B (5), D (2), E (3); IV, giugno 2005 - febbraio 2006, 24 casi, genotipi A (3), B (18), C (1), G (1). Ripetuti campioni prelevati dall'ambiente e dal personale sono risultati costantemente negativi. I principali fattori di rischio identificati sono stati: basso peso alla nascita, prematurità, ventilazione forzata e catetere venoso centrale.

Conclusioni. Genotipi eterogenei sono stati riscontrati nei ceppi studiati. I cloni A e B identificati nei primi 2 clusters, sono stati nuovamente repertati dopo 3 anni nell'ultimo cluster, dimostrando una persistenza nell'ambiente. Non è stata identificata una fonte comune. Il sovraffollamento del reparto in rapporto al calo del personale è stato collegato ai clusters di infezioni. La trasmissione crociata tramite le mani è stata probabilmente una importante via di diffusione. Screening microbiologici ravvicinati, cohorting degli infetti e implementazione delle misure igieniche sono risultati aspetti fondamentali nel contenimento dell'epidemia.

141

GESTIONE DEI GERMI "SENTINELLA": RUOLO DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA

Pieretti B.¹, Moretti M.², Ghiandoni M.G.², Ciaschini G.², Gasperoni S.², Delprete E.²

¹Laboratorio Analisi Ospedale "Valduce", via Dante 11, 22100 Como (CO)

²Laboratorio Analisi Ospedale S. Croce (A.S.U.R. Marche Z.T. n°3 Fano), viale Vittorio Veneto 2, 61032 Fano (PU)

Introduzione. I "microrganismi sentinella" sono caratterizzati da rapida diffusibilità e/o da un pattern di antibiotico resistenza tale da costituire un rilevante problema sanitario per le importanti ricadute cliniche ed economiche. Per questo il Comitato per le Infezioni Ospedaliere (C.I.O.) della Zona Territoriale N°3 di Fano (PU) ha stilato una apposita "Procedura per la gestione dei microrganismi sentinella".

La procedura concordata e condivisa con la Direzione Sanitaria e i reparti definisce un elenco di microrganismi al cui isolamento seguono una serie di "azioni" quali la tempestiva notifica telefonica al reparto e alla Direzione Sanitaria, l'invio del referto cartaceo al reparto e via fax alla Direzione Sanitaria con inclusa una nota che sottolinea la pericolosità dell'isolato e indica le norme da adottare per prevenire la trasmissione del microrganismo ad altri pazienti e/o al personale. Copia del referto è archiviata dal laboratorio in un'apposita rubrica alfabetica utile per una valutazione prospettica nel tempo delle resistenze. Nel nostro lavoro abbiamo valutato numero e tipo di microrganismi "sentinella" isolati nei diversi materiali riferiti a pazienti ricoverati nei reparti a maggior rischio di contrarre infezioni ospedaliere valutandone nel tempo la sensibilità.

Metodi. Per questo tipo di analisi ci siamo avvalsi dei dati ottenuti con i criteri di estrapolazione del sistema Vitek (bioMérieux) elaborandoli in fogli di lavoro Excel.

Risultati. Complessivamente nel periodo aprile 2004-luglio 2005 sono stati isolati 137 germi "sentinella", 63 nel 2004 (3,9%) e 70 nel 2005 (7,5%) dai seguenti materiali: urine (30%), broncoaspirati (29%), ferite chirurgiche (12%), espettorati (9%), emocolture (6%), cateteri (4%), feci (7%) e altri materiali (4%). I microrganismi isolati sono stati: *Pseudomonas aeruginosa* (54%), *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (29%), *Stenotrophomonas maltophilia* (7%), *Enterococcus faecium* Van-A (1%).

L'analisi delle resistenze e delle variazioni della MIC condotta su ceppi di MRSA e *Pseudomonas aeruginosa* (isolati rispettivamente in 16 e 19 pazienti nel 2004 ed in 13 e 21 pazienti nel 2005) e su altri batteri di frequente isolamento in pazienti appartenenti a reparti a rischio (*E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) ha evidenziato un aumento della resistenze con spostamento della MIC verso concentrazioni superiori rispetto all'anno precedente. L'andamento nel tempo delle sensibilità per tali germi è stato confermato anche dal confronto tra gli isolati di pazienti appartenenti a reparti interni con quelli esterni.

Conclusioni. I risultati ottenuti confermano, anche nella nostra realtà, l'importanza del fenomeno antibiotico resistenza e indicano come questo possa essere contrastato in modo efficace ed efficiente solo con un intervento multidisciplinare e multiprofessionale basato sulla costante e solerte collaborazione tra laboratorio di microbiologia clinica, Direzione Sanitaria e reparti di degenza.

142

SEI CASI DI SEPSI CAUSATA DA *PANTOEA SPP.* IN UN POLICLINICO UNIVERSITARIO CALABRESE.

Focà A., Puccio R., Matera G., Capicotto R., Liberto M.C.

Cattedra di Microbiologia, Università "Magna Græcia" di Catanzaro

Introduzione. *Pantoea agglomerans* (sinonimo: *Erwinia herbicola*) è un membro delle Enterobacteriaceae che colonizza piante, acqua e suolo, e che può provocare infezioni opportunistiche; infatti ha causato episodi di setticemia attraverso l'utilizzo di prodotti parenterali contaminati in ospiti immunodepressi. In questo lavoro riportiamo un outbreak causato da *Pantoea spp.* fra pazienti oncologici nel Policlinico Universitario "Mater Domini" di Catanzaro.

Metodi. In un arco di tempo di 3 mesi, *Pantoea spp.* è stata isolata da emocolture in 6 pazienti con differenti tipologie neoplastiche. I campioni ematici sono stati inoculati in flaconi da emocoltura sia per la ricerca di batteri aerobi (Bact/Alert FA, bioMérieux Marcy-l'Etoile, France) che di batteri anaerobi (Bact/Alert FN, bioMérieux) e, dopo un periodo di incubazione di 1-3 giorni, sono state effettuate subculture in agar sangue montone al 5% e agar McConkey (bioMérieux). L'identificazione è stata effettuata mediante la card GN per il sistema Vitek 2 (bioMérieux), e l'antibiogramma eseguito con la card AST N021 per lo stesso sistema automatizzato (bioMérieux).

Risultati. La *Pantoea spp.* è stata isolata in coltura pura dal sangue di 5 pazienti, mentre in un soggetto è stato osservata una coinfezione con *Rahnella aquatilis* e *Candida famata*. Con la metodica da noi utilizzata è stato possibile identificare la specie di *Pantoea* (*Pantoea agglomerans*) soltanto in due pazienti. Per quanto concerne la sensibilità agli antibiotici, tutti gli isolati mostravano lo stesso fenotipo.

Conclusioni. La *Pantoea spp.* può causare in soggetti immunodepressi casi di infezione sistemica che per la loro rarità necessitano di ulteriori approfondimenti. Sono in corso studi molecolari sui ceppi isolati per indagare sugli aspetti epidemiologici di tale infezione.

143

TRIENNIO 2003-2005: INFEZIONI CVC-ASSOCIATE IN PAZIENTI PEDIATRICI ONCOLOGICI

Sodano G., Paparo M., Ricciardi I., Chianese M., D'Antonio G., Lettieri T. and Dello Iacovo R.

S.C. Patologia Clinica, Ospedale Pausilipon, AORN Santobono-Pausilipon, Via Posillipo, 226, 80123 Napoli

Introduzione. Si presenta la casistica triennale delle batteriemie CVC associate. L'emocoltura con prelievo da CVC e da vena periferica è stata condotta su 162 pazienti del Dipartimento di Oncologia pediatrica del P.O. Pausilipon di Napoli, in prevalenza oncoematologici. In ragione dell'alta prevalenza dell'immunosoppressione nei pazienti osservati,

si è condotto lo studio della frequenza delle specie batteriche isolate nei tre anni. Esso suggerisce l'efficacia di accurate misure di prevenzione e del costante dialogo con il clinico per la scelta di una terapia ragionata d'attesa, durante i tempi tecnici dell'identificazione e dell'antibiogramma.

Materiali e metodi. Emocoltura in flaconi pediatrici per aerobi e flaconi per anaerobi (Bact-Alert, Bio-Mérieux). E' in corso di applicazione l'allestimento dell'emocoltura basata sul differential time to positivity (DTP). 162 pazienti, portatori di CVC tunnelizzati e/o impiantabili (Broviac, Port-a-cath, Groshong), hanno dato 589 prelievi (set di flaconi, per batteri aerobi ed anaerobi, inoculati con sangue da CVC e periferico).

Risultati. 137 positivi (69 casi clinici).

Eziologia (media 2003-2005): gram positivi 68%; gram negativi 23,3%; miceti lievitiiformi 8,7%.

	2003	2004	2005
Staf. coagulasi negativa	38.5%	41%	54.1%
Enterobatteri	12.8%	15.3%	10.2%
Streptococcus spp	10.2%	10.3%	20.4%
Pseudomonas spp	15.4%	10.2%	3.4%
Miceti lievitiif.	12.8%	7.7%	6.8%
Corinebact. Spp	5.1%	2.6%	0%
Staf. Aureus	2.6%	2.6%	0%
Altri	2.6%	10.3%	5.1%

tabella 1: frequenza per specie

Conclusioni. I dati confrontati per anno evidenziano:

- 1) progressivo maggior ruolo degli Stafilococchi coagulasi negativi nell'etiologia delle infezioni CVC correlate, legato alla loro costante presenza nella popolazione microbica cutanea residente;
- 2) sporadicità dello Stafilococcus aureus;
- 3) marginalizzazione del ruolo di Pseudomonas e miceti lievitiiformi, espressione di accurate azioni preventive.

È costituita una base di dati-guida all'efficiente uso razionale dei cocktail di antibiotici ad ampio spettro, di prima linea.

144

INFEZIONI DA ROTAVIRUS IN AMBITO NOSOCOMIALE.

Sala E., Spinelli M., Tamborini T., Butti S., Carughi M., Signori R., Longoni E., Cimetti S., Gangemi A., Busnelli M., Bonvini L., Figini P., Giana G.

Gruppo Operativo C.I.O.

Azienda Ospedaliera Sant'Anna - Como

Introduzione. Le infezioni da *Rotavirus* sono causa di gastroenterite acuta nei primi anni di vita: le infezioni comunitarie prevalgono nella fascia di età tra 6 e 23 mesi, quelle ospedaliere tra 0 e 5 mesi. Dal marzo 2005 le infezioni da *Rotavirus* rientrano nel programma di sorveglianza delle infezioni ospedaliere a partenza dal laboratorio di microbiologia. Le rilevazioni di *Rotavirus* sono circa il 30% del totale dei microorganismi sentinella dell'A.O. S. Anna, con la stagionalità caratteristica del virus (novembre-marzo).

Metodi. Sono stati analizzati i dati raccolti dal marzo 2005 all'aprile 2006 nei P.O. di Como e Cantù, relativi ad infezioni da *Rotavirus* in pazienti ricoverati. La diagnosi di infezione da *Rotavirus* è stata effettuata con ricerca dell'Ag. fecale (test immunocromatografico). A seguito del rilevamento si è verificata l'origine dell'infezione: nosocomiale o comunitaria.

Risultati. Su 885 ricerche effettuate (655 presso il PO di Como e 230 a Cantù) sono stati riscontrati 287 campioni positivi (215 Como, 72 Cantù), con una media mensile di 20 casi ed un picco di 43 rilevazioni nel gennaio 2006. L'età dei pazienti è così suddivisa per classi: 0-12 mesi 69 pazienti (24,0%); 13-24 mesi 91 pazienti (31,7%); 25-36 mesi 50 pazienti (17,4%); 37-48 mesi 35 pazienti (12,1%); 49-60 mesi 14 pazienti (4,8%); > 60 mesi 28 pazienti (9,7%). A seguito dell'indagine epidemiologica effettuata, presso il PO Cantù nessun caso è risultato nosocomiale, mentre presso il PO Como, dei 215 casi di infezione l'11,6% è ospedaliero.

Conclusioni.

- 1 - Rotavirus rappresenta un importante agente di gastroenterite acuta per età 0-48 mesi;
- 2 - Il numero di casi rilevati nell'ambito della sorveglianza delle infezioni ospedaliere tramite microrganismi sentinella impone l'adozione di appositi protocolli di gestione del paziente infetto;
- 3 - Il rispetto delle norme di isolamento descritte nel protocollo consente di confinare l'infezione e di limitare l'origine ospedaliera alla minoranza dei casi.

145

NASCE VIGI@CT: UN NUOVO SOFTWARE EPIDEMIOLOGICO E NELLA GESTIONE CLINICA DELLE INFEZIONI OSPEDALIERE.

Torsani E.*, Testa G., Castellani F., Volpones G. B.

*Specializzanda Scuola Spec. Microbiologia e Virologia, Unibo

Introduzione. Le Infezioni Ospedaliere comprendono ogni forma d'infezione che si sviluppi 48-72 ore dopo il ricovero in ospedale; re sono ritenute tra i principali indicatori di qualità dell'assistenza, sono gravate da alta morbidità, alta mortalità e comportano elevati costi sociali. Circa un terzo di queste sono prevenibili con applicazione di adeguati programmi di prevenzione e controllo. Il Laboratorio di Batteriologia svolge un ruolo estremamente importante nella sorveglianza delle infezioni. I cardini di questa sorveglianza sono basati sull'osservazione dei microrganismi isolati (specie, frequenze, percentuali), comparsa di nuove resistenze; (ESBL, MBL, VRE, MRSA, VISA, GISA); monitoraggio dei germi sentinella, segnalazione di possibili infezioni nosocomiali, allertare dei servizi di prevenzione, valutazione dell'efficacia delle azioni intraprese; suggerirne sulle più adeguate terapie empiriche.

Metodi. È stato introdotto nel nostro laboratorio nell'Aprile 2005 un nuovo software epidemiologico: **VIGI@CT** (di Biomérieux). Tale software rappresenta una sorta di "lente d'ingrandimento" che costantemente osserva e controlla tutti i risultati del Laboratorio: infatti è collegato al sistema automatizzato di batteriologia (VITEK system II), dove vengono inseriti anche i dati ottenuti con il sistema semi-automatico (MINI-Api) ed utilizza il sistema esperto avanzato (AES). Lo scopo della mia studio è stato quello di verificare la corrispondenza tra i dati del sistema automatico ed i reports di Vigi@ct, ed in caso di segnalazione di eventuali cluster epidemici la verifica dell'evento segnalato, e la successiva identificazione della fonte d'infezione.

Risultati. Il software mi ha permesso di rilevare un cluster epidemico di MRSA in Rianimazione (4 pazienti coinvolti), di allertare in tempo reale il reparto, di comunicare l'episo-

dio alla Direzione Medica ed al C.I.O., che hanno provveduto ad attuare le idonee misure di controllo.

Conclusioni. Vigi@ct è una soluzione globale con VITEK System II per una nuova visione dell'epidemiologia. Il risultato più importante nella messa a punto di questo nuovo sistema informatico è sicuramente una nuova visione del laboratorio di Microbiologia: non più una realtà isolata, ma uno strumento indispensabile per raggiungere gli obiettivi: controllo e sorveglianza delle infezioni ospedaliere.

146

VALUTAZIONI SULL'ACCURATEZZA DI UN SISTEMA DI SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI OSPEDALIERE

Barni R.¹, Vita M.², Agozzino F.¹, Cattaneo G.¹, Borghetti L.¹, Cavalleri M.¹, Re M.¹, Rescaldani C.¹, Del Corno G.²

¹A.O. "G. Salvini", V.le Forlanini 121, 20020 Garbagnate Milanese (MI)

²Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Milano Bicocca, Via Cadore 48, 20052 Monza (MI)

Introduzione. I dati raccolti routinariamente dai laboratori di microbiologia possono essere utilizzati per descrivere, in maniera sistematica e continuativa, importanti aspetti epidemiologici delle infezioni ospedaliere. Il presente studio analizza, nella realtà di due Presidi della nostra Azienda, l'accuratezza di un sistema di sorveglianza epidemiologica delle infezioni ospedaliere a partenza dal laboratorio.

Metodi. Abbiamo retrospettivamente valutato le cartelle cliniche relative ai ricoveri ordinari, nei Presidi Ospedalieri di Rho e Passirana, di pazienti che avevano presentato un accertamento microbiologico positivo per un agente sentinella nel periodo settembre 2005-dicembre 2005. Gli agenti monitorati sono stati quelli del progetto regionale lombardo "Sorveglianza epidemiologica a partenza dai Laboratori di Microbiologia". La presenza di una infezione ospedaliera è stata definita sulla base dei criteri stabiliti dai CDC di Atlanta.

Risultati. Nel periodo di studio sono stati segnalati dal laboratorio di microbiologia 58 isolamenti; di questi 28 (48%) sono risultati associati ad infezioni ospedaliere, con un tasso di incidenza calcolato sul numero di ricoveri nel quadrimestre pari a 0.69%. Fra gli agenti isolati, sono risultati effettivamente associati ad infezioni ospedaliere solo MRSA (15 casi su 19 isolamenti), Serratia spp (5 su 11), C. difficile (4 su 7), S. maltophilia (2 su 7), Acinetobacter spp (1 su 2) e lieviti (1 su 2).

Conclusioni. Le segnalazioni provenienti dal laboratorio di microbiologia presentano una discreta correlazione con l'effettiva presenza di casi di infezione ospedaliera; il valore predittivo degli isolamenti è tuttavia ampiamente variabile fra i diversi agenti. L'incidenza di infezioni stimate risulta inferiore a quella attesa in base ai dati di letteratura e a quella da noi già calcolata con l'analisi delle notifiche provenienti dai reparti. L'integrazione di differenti approcci metodologici nella sorveglianza epidemiologica delle infezioni ospedaliere pare la migliore strategia per l'accurata rappresentazione del fenomeno.

147

ANTIBIOTICO RESISTENZA DI MYCOPLASMA HOMINIS E UREAPLASMA UREALYTICUM ISOLATI DA TAMPONI VAGINALI

Molinari G. L., Camaggi A., Kroumova V., Crespi I., Schiralli E., Di Natale C., Andreoni S., Fortina G.

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

Metodi. Nel periodo gennaio 2006/giugno 2006, presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Maggiore di Novara, sono stati sottoposti ad indagini batteriologiche n° 1052 tamponi vaginali. Oltre alle colture tradizionali, tali tamponi sono stati sottoposti anche alla ricerca di micoplasmi urogenitali (*Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*), utilizzando il kit Mycoplasma IST 2 della Ditta BioMérieux che consente, in coltura liquida, oltre all'identificazione dei suddetti microrganismi, anche di effettuare contemporaneamente l'antibiogramma, partendo direttamente dal tampone.

Conferme all'isolamento in brodo di *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* sono state ottenute mediante contemporanea semina dei tamponi vaginali anche su terreno solido (*Mycoplasma* A7 Agar - BioMérieux) in modo da poter evidenziare le colonie batteriche attraverso l'osservazione microscopica ad ingrandimento di 10x.

Risultati e conclusioni. *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* sono stati ritrovati in 148 campioni (14,06 % del totale) e dei campioni positivi si è rilevata una netta prevalenza di *Ureaplasma urealyticum* (67,02%) rispetto a *Mycoplasma hominis* (15,41%); in 26 casi (17,57%) si è avuto una presenza contemporanea dei due microrganismi. L'antibiogramma effettuato utilizzando antibiotici normalmente raccomandati dalla letteratura internazionale nei confronti di microrganismi privi di parete batterica (Doxyciclina, Josamicina, Ofloxacina, Eritromicina, Tetraciclina, Pristinamicina, Ciprofloxacina, Azitromicina, Claritromicina) ha consentito di rilevare "in vitro" una sensibilità di *Mycoplasma hominis* a Josamicina, Tetraciclina, Pristinamicina e una totale resistenza nei confronti di Eritromicina e Azitromicina mentre l'altro macrolide, la Claritromicina, si è rivelata efficace nel 50% dei casi. Per quanto riguarda *Ureaplasma urealyticum*, un solo antibiotico si è rivelato sempre attivo "in vitro" (Pristinamicina), mentre la Ciprofloxacina è l'antibiotico che si è rivelato resistente nei confronti del maggior numero di ceppi (40%).

148

VAGINITI E VAGINOSI BATTERICHE: MONITORAGGIO DI MICRORGANISMI ISOLATI DA CAMPIONI CLINICI NELL'ANNO 2005

Capano A.¹, Bonifati A.¹, Di Vasto M.¹, Lisanti N.², Venditti W.¹

¹U.O. semplice di Microbiologia, P.O. di Castrovillari (CS),
Azienda Sanitaria N. 2

²U.O. Ostetricia e Ginecologia

Introduzione. Vaginiti e vaginosi batteriche sono le più

comuni affezioni dell'apparato genitale femminile, considerate nella maggior parte dei casi a trasmissione sessuale, e riguardanti oltre un quarto delle persone sessualmente attive. Esistono diversi tipi di vaginiti ciascuno con caratteristiche particolari dovute all'agente etiologico che le provoca. La vaginosi batterica può essere definita come una complessa modificazione della flora batterica vaginale, che causa una alterazione del normale microbiota, con una riduzione della flora lattobacillare fisiologicamente presente ed un aumento di altri batteri. L'esame colturale dell'essudato vaginale è fondamentale per l'identificazione e l'isolamento del germe responsabile di tali infezioni, e per saggiarne la sensibilità ai chemioterapici. Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la frequenza di isolamento di microrganismi, in campioni di essudato vaginale raccolti nell'arco di un anno presso l'ambulatorio del reparto di Ostetricia e Ginecologia.

Materiali e Metodi. I tamponi vaginali pervenuti alla U.O. semplice di Microbiologia, sono stati così analizzati: un tampone esaminato con un sistema Affirm VPIII, che utilizza una sonda di DNA destinata alla rilevazione e all'identificazione dell'acido nucleico delle specie *Candida*, *Gardnerella v.* e *Trichomonas v.*, un tampone è stato esaminato per via colturale tradizionale. La ricerca dello *Streptococco agalactiae* è stata eseguita mediante semina su terreno Columbia CNA agar, per l'identificazione e il saggio di sensibilità agli antibiotici è stato utilizzato il sistema VITEK 2 COMPACT. I Micoplasmi urogenitali sono stati ricercati utilizzando il kit Mycoplasma IST 2, che prevede l'uso di un brodo di coltura selettivo per i micoplasmi da inoculare in una galleria che permette la coltura, l'identificazione, la conta indicativa e la determinazione della sensibilità agli antibiotici di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma hominis*.

Risultati. I risultati ottenuti su un totale di 323 donne sintomatiche sono stati i seguenti:

157 negativi per batteri e miceti pari al 49%
43 positivi per *Candida* pari al 13%
32 positivi per *Gardnerella v.* pari al 10%
2 positivi per *Trichomonas v.* pari allo 0,5%
7 positivi per *Streptococco agalactiae* pari al 2%
2 positivi per Micoplasmi urogenitali pari allo 0,5%
16 positivi per infezioni miste pari al 4%
80 positivi per germi gram-positivi pari al 25%, rappresentati quasi interamente da *E. coli*.

Conclusioni. I risultati dello studio confermano che *Candida* e *Gardnerella v.* ed *E. coli*, sono i microrganismi più frequentemente isolati nei casi di alterazione del microbiota vaginale. La percentuale di isolamento di *Trichomonas v.* e di Micoplasmi urogenitali risulta piuttosto bassa.

È da evidenziare l'utilità delle sonde molecolari che hanno notevolmente ridotto i tempi di attesa dei risultati (circa un'ora dal momento del prelievo) consentendo pertanto di intraprendere un trattamento terapeutico immediato per contrastare precocemente e adeguatamente l'infezione.

149

SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI E FREQUENZA DI ISOLAMENTO DI *U.UREALYTICUM* IN CAMPIONI DI ESSUDATO CERVICALE

Carcheri M., Caci E., Caligiuri P., Graziani A., Lacitignola G., Oliveri C., Ventura A., Capuzzo R.

Dipartimento di Patologia Clinica, Unità Operativa
Laboratorio Analisi - Azienda Ospedaliera "Villa Scassi" - Genova

Introduzione. *U.urealyticum* può essere responsabile di alcune patologie cervicali. Il suo isolamento da campioni endocervicali è frequente, più raro quello di *M.hominis*. Entrambi, però, possono essere presenti nell'apparato urogenitale in qualità di semplici commensali e la loro frequenza di isolamento è molto variabile in base alla popolazione osservata. Pertanto per poter attribuire ai Micoplasmi un preciso significato patogeno occorre valutare attentamente l'equilibrio batterico dell'intero ecosistema dal quale sono isolati e non si può prescindere dalla determinazione della carica batterica (significativa se $\geq 10^4$ UCC/ml).

Metodi. Nel corso di questo studio sono stati presi in esame 144 tamponi endocervicali provenienti da pazienti che per il 56.9% (82/144) dichiaravano sintomatologia più o meno spiccata (perdite ematiche intermestruali, dolori pelvici mono o bilaterali, eccessive perdite di muco cervicale) o che risultavano totalmente asintomatiche (43.1%). La ricerca dei Micoplasmi è stata eseguita con il kit Mycoplasma IST2 (bioMérieux) che utilizza un brodo di coltura che consente la crescita selettiva dei Micoplasmi e può, dopo la prima incubazione, essere inoculato in una serie di gallerie per l'identificazione, la conta e l'antibiogramma.

Risultati. *U.urealyticum* è stato isolato in 52 campioni (36.1%), *M.hominis* in 4 (2.7%). Nessuno dei ceppi isolati ha mostrato resistenze alle tetracicline (doxiciclina, tetraciclina), né alla pristinamicina e alla josamicina. Verso alcuni macrolidi sono state riscontrate resistenze variabili dall'1.9% (7.7% Intermedi) dell'eriomicina, al 9.6% dell'azitromicina e della claritromicina. La resistenza dimostrata verso l'ofloxacina è stata del 44.2% (7.7% Intermedi). Tutti i 52 ceppi isolati si sono dimostrati resistenti alla ciprofloxacina.

Conclusioni. I dati ottenuti confermano la piuttosto elevata percentuale di isolamenti di *U.urealyticum* in campioni da tampone endocervicale. La sensibilità riscontrata verso le tetracicline è ancora ottima, mentre, come da tendenza attuale, inizia ad apparire una leggera resistenza ai macrolidi ed una più spiccata ai chinoloni.

150

IMPORTANZA DELL'INDAGINE MICROBIOLOGICA NELL'APPROCCIO AL PAZIENTE AFFETTO DA INFERTILITÀ

Trevisan A., Scarin M., Cavallaro A.

Servizio di Microbiologia e Virologia,
Azienda Ospedaliera di Padova

Introduzione. L'infertilità sia maschile che femminile può avere un'eziologia infettiva (*Chlamydia trachomatis*,

Neisseria gonorrhoeae, *Mycoplasma spp.*, *Enterococcus spp.*, ed *Enterobacteriaceae ecc...*) e le indagini microbiologiche possono rappresentare un primo importante approccio di esclusione o di conferma.

Obiettivo. Studio delle infezioni nei soggetti affetti da sterilità.

Metodi. Nel periodo compreso da gennaio a giugno 2005 è stata esaminata una popolazione con diagnosi di infertilità (262 uomini e 46 donne), di età media 37 anni. Il campione era costituito da tampone uretrale o da liquido seminale, per i soggetti maschili, da tampone vaginale e/o cervicale per quelli femminili. Si eseguiva esame microscopico dopo colorazione di Gram, e Giemsa ed esame colturale in agar sangue di montone 5%, agar Columbia-CNA, agar "Can2", agar cioccolato "Polyvitex", agar Martin-Lewis (bioMérieux). La ricerca di *Mycoplasma spp.* era effettuata con "Mycoplasma IST2" (bioMérieux), e la ricerca di *Chlamydia trachomatis* con metodo SDA (Strand Displacement Amplification, Becton Dickinson).

Risultati. Dei 308 campioni esaminati il 30,20 % è risultato positivo alle indagini microbiologiche (43,48% ♀ e 27,86% ♂). I principali microrganismi isolati sono risultati: *U.urealyticum* (15,22% ♀, 10,69% ♂), *G.vaginalis* (8,69% solo ♀), *E.coli* (6,52% ♀ e 4,58% ♂), *M.hominis* (4,35% ♀ e 2,29% ♂), *Enterococcus spp.* (3,43%, solo ♂). *Candida spp.* (4,35% solo ♀), e *S.agalactiae* (4,35% solo ♀). L'unico agente etiologico di MST riscontrato è stato *Chlamydia trachomatis* (1,91% solo ♂).

Conclusioni. Lo studio dimostra che 1/3 della popolazione da noi esaminata risulta positivo all'indagine microbiologica. Tale percentuale così importante suggerisce al clinico di effettuare sempre in questa popolazione un esame microbiologico completo e relativa terapia specifica prima di programmare indagini strumentali e interventi di fecondazione assistita.

151

LA SORVEGLIANZA MICROBIOLOGICA IN GRAVIDANZA SU POPOLAZIONE ITALIANA E STRANIERA

Trevisan A., Scarin M., Cavallaro A.

Servizio di Microbiologia e Virologia,
Azienda Ospedaliera di Padova

Introduzione. La sorveglianza microbiologica rappresenta un punto fondamentale nel controllo e nella prevenzione delle infezioni fetali e delle infezioni perinatali. Responsabili possono essere agenti eziologici delle MST (*Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*), ma anche microrganismi comunemente colonizzanti quali *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.*, e *Listeria monocytogenes*.

Obiettivi. Studio di prevalenza dei microrganismi isolati da tampone vaginale, e cervicale di gravide asintomatiche, di nazionalità italiana e straniera e proposte percorsi diagnostici diversificati sulla base dell'epidemiologia locale.

Metodi. Tra gennaio e giugno 2005 sono state esaminate 988 gravide di cui 743 Italiane e 245 straniere in prevalenza dell'Europa dell'Est. 291 sono state esaminate anche per *Chlamydia* e *Mycoplasma spp.*, 99 straniere e 192 Italiane. Il campione era costituito da tamponi vaginali e da tamponi cervicali. Si eseguiva esame microscopico previa colorazio-

ne di Gram, e Giemsa ed esame colturale in: agar sangue di montone 5%; agar Columbia-CNA; agar "Can2"; agar ciocolato "Polyvitex"; agar Martin-Lewis (bioMérieux). La ricerca di *Mycoplasma spp.* era effettuata con "Mycoplasma IST2" (bioMérieux), e la ricerca di *Chlamydia trachomatis* con metodo SDA (Becton Dickinson).

T.vaginalis era ricercato con esame colturale (Trichomonas Selective Broth Labobasi) ed esame microscopico dopo colorazione di Giemsa e *Listeria monocytogenes* con coltura in brodo Palcam selettivo (arricchimento) e semina in agar Palcam dopo 24 e 48 ore in microaerofilia.

Risultati. 65,49% dei campioni sono risultati negativi, e 34,51% positivi. Le indagini sono risultate positive in misura maggiore tra le straniere (48,57%) con una prevalenza significativa per *Chlamydia* (5,05% contro 0,52%) e di *T.vaginalis* (0,20%) assente nella popolazione italiana. Altri microrganismi isolati sono stati: *U.urealyticum* (25,43%), *Candida spp.* (14,88%), *Streptococcus agalactiae* (6,78%), *G.vaginalis* (3,34%), *C.trachomatis* (2,06%), *M.hominis* (1,03%), *E.coli* (1,01%), Nessun isolamento per *L.monocytogenes*.

Conclusioni. La ricerca di *S.agalactiae* alla 35°-37° settimana rimane un obiettivo primario. Non significativa la ricerca a tappeto di *L.monocytogenes*, Emerge la necessità di un monitoraggio microbiologico diversificato per le gravide di nazionalità non italiana prima del concepimento o nei primi mesi di gravidanza anche per agenti responsabili di MST.

campioni con risultato discordante ai due metodi sono stati ulteriormente valutati con metodica Western blot IgG ed IgM.

Risultati. La valutazione comparativa dei risultati ottenuti con i due metodi oggetto di studio è risultata concordante per 144 campioni (96%), mentre per 6 campioni (4%) si è ottenuta una non reattività con metodica Abbott rispetto al metodo DiaSorin. Tale reattività ha trovato conferma con metodica Western blot IgG, mentre sia la VDRL, che la ricerca IgM con metodica ELISA e Western blot sono risultate negative, escludendo pertanto un'infezione in atto o recente.

Conclusioni. Nella gestione giornaliera di test ad alta frequenza di richiesta come quello della lue è necessario il ricorso a metodiche che sappiano coniugare ad un'elevatissima sensibilità anche costi contenuti e semplicità operativa. Nella nostra esperienza entrambi i metodi si caratterizzano per l'ottima maneggevolezza in termini di automazione e per i bassi costi, ma pur su un campione sicuramente esiguo come quello valutato, è necessaria una seria disamina sulla perdita di sensibilità del metodo Abbott rispetto al metodo DiaSorin. In questa ottica si impone come prioritaria la necessità di un'attenta valutazione fra gli antigeni utilizzati dai due test nel rilevare la risposta anticorpale, oltre che sul principio operativo dei metodi stessi. Appare ovviamente implicito come il numero limitato di sieri studiati suggerisca altre e più estese valutazioni anche su campioni omogenei di popolazione.

152

VALUTAZIONE COMPARATIVA DI DUE METODI AUTOMATICI PER LO SCREENING DI *TREPONEMA PALLIDUM*

Cianci L., Milano F., Pelagi M., Olivieri G., Verza P., Guazzotti G.C.

S.O.C. Microbiologia Ospedale "S. Andrea" ASL - I I
Corso M. Abbiate 21, 13100 Vercelli

Introduzione. La necessità di disporre di un metodo di screening affidabile per la gestione dell'infezione luetica, non soggiace solo ad una logica organizzativa all'interno dei laboratori diagnostici, ma trova reale fondamento nell'incremento che l'infezione di *Treponema pallidum* ha assunto non solo negli USA ma anche in Europa.

Nella nostra realtà operativa, si è cercato di introdurre un metodo di routine che consentisse di coniugare affidabilità in termini di risultato con semplificazione gestionale.

Materiali e metodi. Sono stati valutati 150 campioni per i quali era richiesta un'indagine per lue di routine, in assenza di qualsiasi segno e/o sintomo riconducibile ad una possibile infezione in atto e/o recente. Tutti i campioni sono stati processati con il test qualitativo Sifilide TP Architect® (Abbott). Il test in oggetto si fonda su un dosaggio indiretto a due step (impiego di antigeni ricombinati TpN15, TpN17, TpN 47) che sfrutta la tecnologia di rilevazione CMIA e quindi lettura in chemiluminescenza ed espressione dei risultati in RLU. Gli stessi campioni sono stati processati con il test qualitativo LIASION® Treponema Screen (DiaSorin) che sfrutta il principio del dosaggio sandwich a uno step ed impiega tecnologia di rivelazione in chemiluminescenza (CLIA) con espressione dei risultati in Index. I campioni reattivi sono stati confermati con VDRL e ricerca delle IgM in ELISA. I

153

INCIDENZA ED ANTIBIOTICORESISTENZA DEI MICOPLASMI UROGENITALI IN DONNE IN GRAVIDANZA

Colosimo M., Focarelli V., Rondinelli V., Saraceno R., Giglio S., Pascale F., Vavalà M., Pascale M.G., Dragone M., Caruso G., Lamazza S., Mancuso V., Morrone P., Masciari R.

Virologia e Microbiologia Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio,
Presidio Pugliese, Via Pio X, 88100 Catanzaro

Introduzione. Uno dei principali agenti eziologici delle infezioni dell'apparato urogenitale è il micoplasma, di cui si distinguono due generi: *Mycoplasma hominis* ed *Ureaplasma urealyticum*. Essi, in gravidanza, possono provocare aborto spontaneo, RPM, parto pretermine, infezioni placentari e corioamnioniti e, nei nati da donne infette, patologie respiratorie e meningiti.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare, in tamponi vaginali effettuati in donne gravide, quasi sempre asintomatiche, la frequenza del loro isolamento, la coinfezione con altri germi e l'antibioticoresistenza.

Materiali e metodi. Nel periodo compreso tra gennaio 2003 e maggio 2006 abbiamo esaminato 9.557 tamponi vaginali di cui 1903 (19,91%) provenienti da donne gravide. Il kit che abbiamo usato è stato il *Mycoplasma IST 2* (bioMérieux) che consente la coltura, l'identificazione, la conta indicativa e la determinazione della sensibilità agli antibiotici. La conta consente di differenziare lo stato di commensalismo dalla vera infezione ($\geq 10^4$ UFC).

Risultati. Tra le 1903 gravide solo 682 (35,8%) richiedevano specificatamente la ricerca dei micoplasmi. Dei 682 tamponi, 107 (15,7%) sono risultati positivi per ureaplasma; uno (0,91%) anche per *m. hominis* ed uno (0,91%)

solo per quest'ultimo.

In 26 tamponi (3,8%) si riscontrava una coinfezione micoplasma-candida; in 5 (0,7%) una coinfezione con enterococco; in 1 (0,15%) una coinfezione con escherichia. L'analisi dell'antibiogramma ha evidenziato che, nelle donne con infezione singola da micoplasma, le resistenze più frequenti sono a carico di ciprofloxacina ed ofloxacina (55%) e di azitromicina ed eritromicina (17%). Nei casi di coinfezione con candida si è registrata una elevata resistenza per azitromicina (57%).

Conclusioni. Per la prevenzione di eventuali patologie ostetriche, puerperali e neonatali è necessario eseguire durante la gravidanza la ricerca dei micoplasmi urogenitali. Attualmente stiamo valutando l'opportunità di utilizzare tecniche di biologia molecolare (PCR) che consentirebbero, secondo quanto riportato in letteratura, di aumentare la sensibilità di rilevazione dei casi positivi.

154

INCIDENZA E PREVALENZA DI HPV IN DONNE SOTTOPOSTE A SCREENING PER IL CARCINOMA CERVICO-VAGINALE.

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

*Laboratorio Analisi Sant'Ambrogio - Vigevano (PV)

**Studio Consulenza Citologica - Vigevano (PV)

***Studio Medico Ginecologico - Vigevano (PV)

Introduzione. Una delle più comuni malattie a trasmissione sessuale è l'infezione genitale da HPV con una incidenza che raggiunge fino al 46% delle patologie conosciute. Molti dati epidemiologici e molecolari hanno dimostrato che l'infezione da HPV è associata spesso allo sviluppo di neoplasia intraepiteliale cervicale di grado 2/3 e di cancro cervicale; tali risultati hanno inoltre indicato come la ricerca di alcuni genotipi di HPV, in particolare il numero 16, possono essere utili nel monitoraggio di donne che presentano un pap test anomalo. In letteratura infatti è ormai nota l'associazione tra HPV 16 e insorgenza di carcinoma cervico-vulvare.

Scopo. Data l'alta correlazione tra l'insorgenza di infezioni virali e carcinoma cervico-vaginale, con il presente studio preliminare abbiamo voluto valutare la distribuzione dei genotipi a basso ed alto rischio in correlazione al quadro clinico riscontrato dallo specialista.

Materiali e metodi. Da gennaio a maggio 2006 su 36 campioni cervico-vaginali di donne con età compresa tra 19 e 58 anni (media 36) è stato eseguito un esame citologico tradizionale (PAP test) o esame citologico in fase liquida. Sui campioni positivi è stata successivamente effettuata la ricerca e la tipizzazione del DNA/HPV attraverso una reazione di amplificazione genica (PCR) e successivo sequenziamento del genoma virale.

Risultati. Le analisi effettuate hanno rilevato la presenza di HPV-DNA nel 55% dei casi. Sono stati riscontrati 9 differenti genotipi 1 a basso rischio (BR) e 8 ad alto rischio (AR). Il genotipo più frequente è stato HPV 16 con una percentuale del 35% seguito da HPV 31, HPV 33 e HPV 66.

Conclusioni. I risultati mostrano una prevalenza dei genotipi AR con un'alta incidenza del numero 16 mentre fra quelli a basso rischio l'unico riscontrato è stato HPV 91. Su 20 DNA-HPV positivi abbiamo riscontrato 4 ascus e 16 cin 1 rivelando una buona concordanza fra l'esame citologico e il

riscontro di presenza di HPV-DNA.

I dati preliminari ottenuti ci hanno spinto a continuare l'indagine diagnostica rivolgendola non solo alla valutazione del dato epidemiologico in sé ma in particolare alla comparsa di segni citopatologici significativi.

155

VAGINOSI, VULVOVAGINITI O VULVODINIA? UN ANNO DI INDAGINE

Labonia M., Li Bergoli M., Casparini T., Santini S.A.

Lab. Analisi Chimico-Cliniche Microbiologiche
Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza "IRCCS"
San Giovanni Rotondo - FG -

Introduzione. Le infezioni dell'apparato genitale femminile rappresentano un problema ginecologico diffuso, la cui incidenza sembra essere in aumento. La maggioranza delle diagnosi si riferisce a:

- Vaginosi batteriche (sindrome polimicrobica caratterizzata da una radicale modificazione dell'ecosistema vaginale per sostituzione della normale flora lattobacillare con una a prevalente composizione anaerobia)
- Vulvo-vaginiti da Candida
- Vulvo-vaginiti da Trichomonas vaginalis.

Metodi. Nel periodo Maggio 2005 – Aprile 2006 sono stati eseguiti 1325 tamponi vaginali. L'età media delle donne era di 30 anni. A tutti i campioni, effettuati dopo somministrazione di un questionario per la raccolta delle notizie cliniche, sono stati applicati i *criteri diagnostici clinici di Amsel* per lo studio delle vaginosi. I campioni sono stati seminati sui terreni di coltura appropriati e incubati a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ per 24 - 48 ore. Sui campioni risultati positivi per Candida è stata eseguita la ricerca dei tubuli germinativi e l'identificazione biochimica mediante Card-YST BioMérieux. La ricerca del Trichomonas è stata eseguita solo mediante esame microscopico a fresco.

Risultati. 954(72%) campioni sono risultati negativi. 371(28%), risultati positivi, sono così rappresentati: vaginosi batteriche 30%, vulvo-vaginiti micotiche 65%, vaginiti da Trichomonas 5%.

Conclusioni. Dal nostro studio emergono due elementi:

- Una diversa distribuzione percentuale degli agenti eziologici responsabili di vaginiti rispetto ai dati di letteratura, forse perché la vaginosi ha una sintomatologia più sfumata della vaginite e questo potrebbe spingere le donne a non controllarsi.
- L'incidenza dei positivi è risultata molto bassa, nonostante tutte le donne studiate fossero sintomatiche (soprattutto prurito). Probabilmente la causa di tali disturbi è da attribuire ad una patologia non infettiva, come la Vulvodinia (oggi sottostimata) che si presenta tipicamente con flogosi e secrezioni mucose, le quali possono costituire un "terreno di coltura" per batteri d'origine intestinale o cutanei, la cui presenza può indurre ad un errore diagnostico e/o terapeutico.

156

PREVALENZA DI CHLAMYDIA T. NEL TRATTO UROGENITALE NEL PERIODO 2001-2005 NEL TERRITORIO DI FASANO

Muolo V., Andriulo B., Carucci A., Pannofino A., Legrottaglie A., Vinci E.

U.O. Patologia Clinica Ostuni-Fasano, AUSL BR/I.

Introduzione. Le Chlamidie sono piccoli batteri Gram-negativi di forma coccoide, parassiti endocellulari obbligati. Tassonomicamente inquadrati nell'ordine Chlamydiales, famiglia Chlamydiaceae, nel genere Chlamydia viene riconosciuta la specie patogena per l'uomo: Chlamydia trachomatis. Questa può causare una caratteristica sindrome essudativa "simil-gonococcica". Nel tratto genitale, le fasi iniziali dell'infezione non provocano sintomi nel 90% delle persone e tale decorso asintomatico è più frequente nella donna. Qualora si determini un quadro di malattia, si evidenzia una classica sindrome essudativa, con predominanza dei segni di uretrite nel maschio e nella femmina di cervicite, salpingite e di Malattia Pelvica Infiammatoria (PID) che benché di genesi multimicrobica, riconosce nella Chlamidia uno degli agenti eziologici più comuni. Nostro obiettivo è valutare la reale incidenza in una popolazione ambulatoriale come quella afferente al nostro laboratorio.

Metodi. Nel periodo 2001-2005 abbiamo valutato 2125 tamponi cervicali e 605 campioni di mitto urinario iniziale (MIU) di cui 535 di uomini e 70 di donne. La ricerca di Chlamydia T. è stata effettuata su tampone cervicale o nelle urine del mitto iniziale mediante metodica EIA CLARVIEW della ditta OXOID.

Risultati. Abbiamo riscontrato su 2125 tamponi cervicali una percentuale di positività per Chlamydia T. del 5,7 %. La percentuale aumenta al 16,8 % sui campioni di MIU maschili e al 14,6 % su MIU delle donne.

Conclusioni. Riteniamo significative ed importanti tali percentuali di positività riscontrate su una popolazione ambulatoriale. Interessante notare che la percentuale di positività aumenta significativamente quando il patogeno viene ricercato solo sul MIU così come si fa nell'uomo. Ciò è da mettere in relazione non ad una reale incidenza superiore nell'uomo, ma perché in tal caso il metodo presenta una maggiore sensibilità probabilmente per una maggiore disponibilità di cellule rispetto all'isolamento da tampone cervicale. Ciò viene confermato qualora la ricerca su MIU venga effettuata anche nella donna. In tal caso la % di positività sale al 14,65 diventando del tutto sovrapponibile a quella dell'uomo (16,8).

157

PREVALENZA DI INFEZIONE DA CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN DONNE GRAVIDE

Perandin F, Pollara C, Cariani E, Terlenghi L, Gargiulo F, C. Bonfanti, M. De Francesco, Manca N

Servizio di Microbiologia e Virologia, A. O. Spedali Civili Brescia, 25123 Brescia

Introduzione. La diagnosi di infezione da Chlamydia tra-

chomatis nelle donne in gravidanza assume un ruolo particolarmente importante in quanto tale infezione viene associata a complicanze come ritardo di crescita intrauterina, minaccia di parto pretermine o aborto, rottura prematura delle membrane, gravidanze ectopiche, endometrite postpartum, aumentata frequenza di neonati di basso peso alla nascita e infezione neonatale come congiuntivite, polmonite interstiziale e tracoma. Con il presente studio abbiamo voluto valutare la prevalenza di Chlamydia trachomatis in un gruppo di donne gravide a rischio di infezione.

Materiali e metodi. Nel periodo gennaio 2004-maggio 2006, abbiamo analizzato 570 campioni cervicali provenienti da donne in gravidanza sottoposte allo screening gravidico (range di età 22-45anni) delle quali 213 avevano un'anamnesi positiva per vari fattori di rischio (più partners sessuali, malattie sessualmente trasmissibili, aborti ripetuti etc.). La metodica utilizzata per valutare la presenza del microrganismo è rappresentata dal sistema BD ProbeTec della ditta Becton Dickinson che utilizza la tecnologia SDA (strand displacement amplification).

Risultati. Delle 570 pazienti sottoposte ad indagine, in 19 di esse è stata riscontrata Chlamydia trachomatis (3.3%); nel gruppo a rischio le pazienti positive sono risultate 9 (4.2%).

Conclusioni. I dati ottenuti sono in accordo con quelli della letteratura per quanto riguarda la prevalenza di infezione da Chlamydia trachomatis nelle donne in gravidanza. Inoltre la popolazione a rischio da noi studiata evidenzia come lo screening precoce mediante tecnologia SDA sia necessario per prevenire un'eventuale infezione perinatale o al momento del parto.

158

EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI MTS DA CHLAMYDIA TRACHOMATIS E NEISSERIA GONORRHOEAE IN TRE OSPEDALI DEL NORD ITALIA

Gruppo di lavoro Amcli sulle Infezioni Sessualmente Trasmesse (GLIST)

Introduzione. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (1999) ogni anno l'impatto delle infezioni a trasmissione sessuale (MTS) curabili viene stimato in 340 milioni di nuovi casi/anno tra gli adulti. In particolare si contano in 62 milioni di casi/anno le infezioni da *Neisseria gonorrhoeae* e in 89 milioni di casi/anno quelle da *Chlamydia trachomatis*. Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'incidenza di casi positivi per *N. gonorrhoeae* o *C. trachomatis* in una popolazione suddivisa per fasce di età e sesso, afferente nell'anno 2005 in 2 ospedali campione della regione Lombardia e 1 di Torino.

Metodi. I tamponi cervicali e uretrali femminili e quelli uretrali maschili sono stati indagati per *N. gonorrhoeae* attraverso esame microscopico ed esame culturale mediante semina su terreno Thayer-Martin (incubato a 37°C in CO₂ per 48h), mentre per la ricerca di *C. trachomatis* sono stati utilizzati metodiche di biologia molecolare.

Risultati. Sono stati indagati per *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* complessivamente 470 tamponi uretrali maschili e 4693 tamponi cervicali e uretrali femminili suddividendo la popolazione in 3 fasce di età (15-25, 26-35 e >35 anni). Per quanto riguarda la popolazione maschile i casi positivi per *N. gonorrhoeae* sono risultati essere i seguenti: 0,6%, 1,9% e

1,3% rispettivamente per le fasce di età 15-25, 26-35 e >35 anni, mentre quelli positivi per *C. trachomatis* 5,5%, 11,3% e 6,7% rispettivamente per le 3 fasce di età considerate.

Per la popolazione femminile sono risultate positive per *N. gonorrhoeae* solo donne di età compresa tra i 15 e i 25 anni (0,6%), mentre sono risultate positive tutte le fasce di età considerate per *C. trachomatis* (2,9%, 2,0% e 1,6% rispettivamente).

Conclusioni. La casistica raccolta non fa parte esclusivamente di centri MTS ed è auspicabile che sia possibile in un momento successivo estendere l'indagine epidemiologica ad un bacino più ampio.

158A

RICERCA DI *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* IN CAMPIONI DI ESSUDATO CERVICALE

Carcheri M., Caci E., Chiossone I., Ferretti A.M., Milano P., Muselli L., Oliveri C., Capuzzo R.

Dipartimento di Patologia Clinica,
Unità Operativa Laboratorio Analisi
Azienda Ospedaliera "Villa Scassi" - Genova

Introduzione. L'infezione da *Chlamydia trachomatis* è una delle malattie a trasmissione sessuale più diffuse nel mondo e, nella donna, decorrendo spesso in modo asintomatico può essere accompagnata da gravi sequele quali Malattia Infiammatoria Pelvica (MIP), endometriti, salpingiti, infertilità.

Metodi. Sono state prese in esame 144 donne suddivise in fasce d'età (<20 anni: 1, 20-25: 7, 26-30: 32, 31-35: 36, 36-40: 52, 41-45: 16). 82 (56,9%) che denunciavano perdite ematiche intermestruali, dolori pelvici mono o bilaterali saltuari o costanti, leucorrea eccessiva. 56 (38,8%) dichiaravano difficoltà di concepimento o infertilità. 42 (29,1) avevano avuto negli ultimi sei mesi rapporti sessuali con più partner. 102 (79,8) non facevano uso di preservativo. La ricerca di *C. trachomatis* è stata eseguita su campione ottenuto tramite cyto-brush endocervicale, utilizzando il kit Gen-Probe Amplified Chlamydia trachomatis (bioMerieux).

Risultati. È stata identificata la presenza di *C. trachomatis* nell'essudato cervicale di 6 pazienti su 144 (4,2%). 2 appartenevano alla fascia d'età 20-25, 1 alla fascia 31-35 e 3 a quella 26-30. 5 delle 6 pazienti positive rientravano nel gruppo delle 42 donne che avevano dichiarato di aver avuto rapporti con più partner negli ultimi sei mesi. Tutte appartenevano al gruppo che non usava abitualmente il preservativo.

Conclusioni. I risultati ottenuti confermano che l'infezione da *C. trachomatis* è ancora sufficientemente diffusa, soprattutto nelle fasce d'età più giovani e nel gruppo dei soggetti a più intensa attività sessuale. 4 delle pazienti risultate positive sono state sottoposte a terapia con doxiciclina (Bassado 100 mg compresse), 1 compressa 2 volte al giorno per os, per una settimana. Le altre 2 pazienti, che denunciavano una riconosciuta ipersensibilità alle tetracicline, sono state trattate con azitromicina, dose singola (2g) (Zitromax-Pfizer).

La ripetizione del test di amplificazione genica eseguita sulle stesse pazienti da 10 a 30 giorni dopo la fine della terapia, ha dato in tutti i casi esito negativo.

159

PREVENZIONE DELLA DIFFUSIONE DI MRSA: ESPERIENZA DI 5 ANNI DI SORVEGLIANZA MICROBIOLOGICA E PROTOCOLLO DI INTERVENTO IN UN IRCCS PEDIATRICO

Busetti M.¹, Cerchi R.¹, Germanis L.², Macorini D.¹, Serra P.¹, Znidarcic C.¹

¹Laboratorio di Microbiologia, UCO Igiene e Med. Preventiva, Università degli Studi di Trieste,

²Servizio Infezioni Ospedaliere (SCIO), IRCCS Burlo Garofolo, Via dell'Istria 65/1, 34100 Trieste

Introduzione. Lo *Staphylococcus aureus* Meticillino-Resistente (MRSA) è di frequente isolamento in molte strutture nosocomiali con lo sviluppo di vere e proprie epidemie, fenomeno sostenuto dall'elevato utilizzo di antibiotici ad ampio spettro; la sorveglianza attiva è utile a contenerne la diffusione nelle strutture in cui questo microrganismo non è endemico. Obiettivi dello studio sono: valutare la frequenza di MRSA isolato da campioni di pazienti ricoverati presso l'IRCCS "Burlo Garofolo" di Trieste dal 2001 al 2005; ridurre l'incidenza di infezioni nosocomiali da MRSA attraverso la sorveglianza attiva e verificare l'efficacia di protocolli comportamentali atti ad evitarne la diffusione.

Metodi. Dal 2002 è attivo un protocollo per la sorveglianza della diffusione di MRSA: ogni nuovo isolamento di MRSA viene segnalato tempestivamente dalla Microbiologia al SCIO ed alla Struttura Operativa di provenienza. A quest'ultima viene inviata una scheda di segnalazione che sarà completata dal personale del reparto e quindi inviata al SCIO. Nel sospetto di un outbreak viene attivato il Gruppo Operativo (GO) che assieme al personale della struttura interessata procede ad una indagine epidemiologica, rivede la bibliografia, rivaluta procedure e protocolli di prevenzione.

Risultati. La sorveglianza microbiologica ha permesso di rilevare 13 nuovi isolamenti MRSA nell'anno 2001, 5 nel 2002, 4 nel 2003, 26 nel 2004 e 40 casi nel 2005. Nei pazienti del Centro Fibrosi Cistica si è evidenziato un trend in aumento (6 nuovi casi nel 2004 e 5 nel 2005) rispetto al 2001 (2 casi). Sono state evidenziate 2 epidemie in Terapia Intensiva Neonatale (TIN), rispettivamente nel 2001 (11 casi) e nel 2005 (6 casi), ed 1 epidemia in Ematologia-Centro Trapianti nel 2004 (7 casi). In tali occasioni è stata organizzata una riunione con il GO ed il personale dei Reparti interessati, evidenziando i punti critici e rivisitando le procedure seguite dal Personale Sanitario e dai familiari che prestano assistenza. L'apporto di alcune modifiche ai protocolli comportamentali ha portato all'esaurimento delle epidemie in breve tempo.

Conclusioni. Lo studio conferma l'importanza della Microbiologia come osservatorio degli eventi sentinella. Le tempestive segnalazioni del Laboratorio e le riunioni interdisciplinari coordinate dal GO permettono il continuo controllo sulle colonizzazioni da MRSA, rafforzando le procedure comportamentali atte a diminuire la loro diffusione epidemica.

160

RICERCA DEL GENE *mecA* MEDIANTE REAL-TIME PCR IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Grasso S., Kroumova V., Caroppo M. S., Grossini E.,
Macaluso P., Fonio P., Fortina G.

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

Introduzione. Gli stipti di *Staphylococcus aureus* resistenti alle penicilline sintetiche (meticillina, oxacillina,) vengono contrassegnati con la denominazione MRSA (*S.aureus* meticillina resistente). Virtualmente tutti gli MRSA producono PBP (penicillin-binding protein) e PBP 2a (codificata dal gene *mecA*) che conferiscono resistenza a tutti gli agenti beta-lattamici disponibili.

La rilevazione del gene *mecA* è il metodo fondamentale per la rilevazione di meticillino-resistenza.

Roche Diagnostics ha sviluppato un kit Lightcycler in PCR Real-time per la rilevazione di tale gene.

Scopo del lavoro è verificare l'applicabilità in un laboratorio di microbiologia delle nuove tecniche di biologia molecolare in real-time PCR rispetto al metodo tradizionale di Kirby-Bauer.

Metodi. Sono stati analizzati 80 ceppi di *S.aureus* a partire da materiali diversi. L'analisi dei campioni è stata effettuata sia con lo strumento LightCycler (Roche) sia con il metodo tradizionale Kirby-Bauer.

Risultati. Su 80 ceppi di *S.aureus* analizzati, 31 sono risultati resistenti alla meticillina e 32 hanno evidenziato la presenza del gene *mecA*. In un unico caso si è avuta una discordanza con positività per il gene *MecA* e negatività per la meticillino-resistenza. Complessivamente si è evidenziata una concordanza nel 98.8% dei casi e una discordanza nel 1.2% dei casi.

Conclusioni. La metodica molecolare presenta vantaggi rispetto a quella tradizionale soprattutto per i tempi rapidi di effettuazione e, probabilmente, per la sensibilità. Inoltre la rapidità del test consentirà di attivare un processo tendente a ridurre l'incidenza di ceppi meticillino-resistenti e di meglio indirizzare la terapia antibiotica con significative ripercussioni per il paziente ed un migliore utilizzo delle molecole antibiotiche stesse.

161

MUTAZIONI ASSOCIATE A FARMACORESISTENZA NEL PLASMA E NEI LINFOCITI DI SOGGETTI HIV-1 SIEROPOSITIVI

Alessandrini F.; Bon I.; Gorini G.; Schiavone P.; Vitone F.

D.M.C.S.S. Sez. di Microbiologia, Università di Bologna,
Osp. S.Orsola-Malpighi, via Massarenti 9, 40138 Bologna.

Introduzione. La determinazione della farmaco-resistenza, diventata uno strumento fondamentale per l'ottimizzazione della terapia nel soggetto HIV-1 infetto, viene di norma eseguita sul plasma del paziente in esame. Bisogna però tenere in considerazione, che il virus, sin dai primi stadi dell'infezione, è in grado di latentizzarsi in alcuni distretti anatomici (*reservoirs* virali), protetti sia dall'intervento immunologico che farmacologico.

Scopo della nostra ricerca è stato quello di verificare la presenza di mutazioni conferenti farmacoresistenza sia nel compartimento plasmatico sia in quello cellulare in un gruppo di soggetti HIV-1 infetti e mai sottoposti a terapia antiretrovirale, al fine di fornire al clinico uno strumento per una gestione terapeutica personalizzata del singolo paziente.

Metodi. Sono stati analizzati i profili di resistenza nei linfomonociti e nel plasma di 31 pazienti, naive al trattamento antiretrovirale, utilizzando il kit TRUGENE HIV-1 GENOTYPING (Bayer).

Risultati. Il sequenziamento diretto (regione RT) dell'RNA plasmatico pur avendo dimostrato la presenza del virus *wilde type* nella maggior parte dei campioni, ha messo in evidenza in sei campioni una serie di mutazioni conferenti farmacoresistenza nei confronti dei NRTI e NNRTI; mentre a livello della regione della PR si è rilevata la presenza di una serie di polimorfismi e mutazioni secondarie, non direttamente collegate a fenomeni di resistenza. D'altro canto, la presenza di *sequenze virali archiviate* che albergano mutazioni chiave è stata messa in evidenza esclusivamente quando l'analisi genotipica veniva effettuata a livello dei PBMCs.

Conclusioni. L'analisi genetica di pazienti mai trattati farmacologicamente ha messo in evidenza un numero contenuto di mutazioni primarie e di polimorfismi, la cui presenza sottolinea comunque l'importanza di eseguire un test di genotipizzazione prima di iniziare un trattamento antivirale; inoltre, di particolare interesse, la possibilità di verificare la presenza di mutazioni "archivate" a livello cellulare (non altrimenti evidenziabili) rappresenta un passo importante per un corretto ed efficace monitoraggio farmacologico.

162

NUOVO SAGGIO FISH PER LA RICERCA DEL DNA DI HPV COMBINATO AD IHC CHEMILUMINESCENTE PER LA QUANTIFICAZIONE DI P16^{INK4A} IN LESIONI CERVICALI

Ambretti S.^{1,2}, Venturoli S.², Mirasoli M.³, Cricca M.^{2,4}, Santini D.⁵, Guardigli M.³, Rizzoli M.³, Zerbini M.², Musiani M.²

¹Scuola di specializzazione in Microbiologia e Virologia, Università di Bologna,

²D.M.C.S.S. Sez. di Microbiologia, Università di Bologna,

³Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna,

⁴C.R.R.E.M., Sez. di Microbiologia, Osp. S.Orsola-Malpighi, Via Massarenti 9, 40138 Bologna

⁵D.C.S.R.I. Sez. di Anatomia Patologica, Osp. S.Orsola-Malpighi, Via Massarenti 9, 40138 Bologna

Introduzione. In lesioni neoplastiche della cervice uterina e di altri distretti, associate all'infezione da Papillomavirus umani (HPV) ad alto rischio oncogeno, l'espressione della p16^{INK4A}, una proteina coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, risulta aumentata. Tale fenomeno è dovuto all'inattivazione funzionale, da parte dell'oncoproteina virale E7, di pRb, che normalmente mantiene bassi i livelli della p16^{INK4A} attraverso un meccanismo di feedback negativo.

Metodi. Allo scopo di valutare l'associazione tra HPV, espressione della p16^{INK4A} e grado delle lesioni cervicali, abbiamo messo a punto un saggio di ibridazione in situ con rivelazione fluorescente (FISH) per la ricerca del DNA di HPV, combinato ad una tecnica di immunistochemica (IHC) per la quantificazione della p16^{INK4A}.

Per la rivelazione della IHC è stato scelto un substrato chemiluminescente che, oltre a garantire alti livelli di sensibilità e specificità, consente un'acquisizione e una rielaborazione del segnale automatizzate e quindi oggettive. La valutazione quantitativa della p16^{INK4A} prevede uno score nel quale sono considerati sia l'intensità media del segnale positivo sia la percentuale di epitelio in cui si ha sovraespressione della proteina.

Il saggio è stato applicato all'analisi di 85 campioni istologici provenienti da biopsie cervicali: 37 lesioni benigne, 20 neoplasie intraepiteliali cervicali di basso grado (CIN1), 28 di alto grado (CIN2-3).

Risultati. L'analisi dei campioni ha evidenziato un aumento delle percentuali di positività sia per HPV, sia per p16^{INK4A}, passando dalle lesioni benigne (rispettivamente 43.4 e 8.1%), ai CIN1 (60.0 e 75.0%), ai CIN2-3 (85.7 e 96.4%). Dal punto di vista quantitativo, l'espressione della p16^{INK4A} risulta essere significativamente più elevata nelle lesioni di alto grado (score medio 1,23) rispetto alle lesioni di basso grado (score medio 0,64).

Discussione. La sovraespressione della p16^{INK4A} risulta avere una specificità maggiore, rispetto alla positività al DNA di HPV, nel riconoscimento delle lesioni neoplastiche HPV-correlate. Inoltre, i dati quantitativi confermano come l'espressione della p16^{INK4A} aumenti con un andamento che segue il grado istologico della lesione cervicale.

La tecnica da noi messa a punto si propone quindi come un utile mezzo diagnostico in grado di rilevare in un unico campione la presenza del DNA virale e il livello di espressione di una proteina che ha significato di marker di progressione neoplastica.

163

USO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSI DELLE SEPSI IN PAZIENTI IN ETÀ PEDIATRICA: DESCRIZIONE DI 3 CASI

Bandettini R., Ricagni L., Pescetto L., Ferrari P., Fenu ML., Formiga A., Pellettieri A., di Marco E.

*Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ist. G. Gaslini, Genova.

Introduzione. Le sepsi nei pazienti in età pediatrica richiedono un tempestivo intervento diagnostico, terapeutico. La velocità è essenziale. La biologia molecolare mette a disposizione test che accorciano i tempi nella identificazione degli agenti eziologici permettendo quindi una rapida correzione della terapia antibiotica. In questo lavoro descriviamo 3 casi di sepsi ricoverati nel nostro Istituto tra il 2005 ed il 2006, in cui l'uso della PCR è stato di estremo aiuto.

Materiali e metodi.

- 1) Bambino di 22 mesi all'ammissione presenta un quadro clinico pseudo-influenzale, con faringo-tonsillite essudativa, rarissime maculo-papule sull'addome, assenza di segni meningei, leucocitosi neutrofila e C-RP negativa. Con la real time PCR viene identificata in meno di 2 ore *N.meningitidis* sia in campioni di sangue che di urine, confermata a distanza di 48 ore dall'emocoltura.
- 2) Bambino di 1 anno presenta all'ammissione uno stato soporoso, con febbre e lesioni ecchimotiche cutanee agli arti inferiori successivamente diagnosticate come purpura fulminans. La ricerca di antigeni urinari dà esito positivo per *S.pneumoniae*. confermato con la nested PCR su sangue, mentre le emocolture danno esito negativo in quanto già in terapia con ceftriaxone.
- 3) Bambina di 8 anni presenta all'ammissione uno stato di shock settico con petecchie e manifestazioni ecchimotiche diffuse. Con la real time PCR viene segnalata la positività per *N.meningitidis*, la ricerca degli antigeni urinari dà esito aspecifico e le emocolture sono negative in quanto già in terapia con ceftriaxone.

Conclusione. Le tecnologie messe a disposizione dalla biologia molecolare migliorano la qualità del lavoro del microbiologo e del clinico. Come sappiamo dalla letteratura la PCR è dotata di elevata sensibilità e specificità, non risente della eventuale terapia antibiotica già somministrata o in corso e permette una rapida identificazione con possibilità da parte del clinico di iniziare immediatamente una terapia mirata.

164

DIAGNOSI DI ASPERGILLOSI INVASIVA SU SIERO MEDIANTE ESTRAZIONE CON SISTEMA MINIMAG E REAL-TIME PCR

Bassani L.³, Colombrita D.¹, Minini C.³, Draghin E.¹, Fiorentini S.³, Foresti I.¹, Garrafa E.³, Cattaneo C.², Bottelli C.², Rossi G.², Caruso A.³.

¹Servizio di Microbiologia, P. O. Umberto I ° A. O. Spedali Civili, Brescia

²U. O. Ematologia, Spedali Civili, Brescia

³Sezione Microbiologia, Università degli Studi, Brescia

Introduzione. La diagnosi di Aspergilloso invasiva mediante RT-PCR, presenta ancor oggi notevoli difficoltà. In questo studio, oltre a verificare la validità di 4 metodi di estrazione su ceppi di *Aspergillus fumigatus*, abbiamo utilizzato quello risultato più valido, sul siero di pazienti ematologici, con successiva amplificazione-rivelazione con RT-PCR, per la diagnosi di Aspergilloso invasiva.

Metodi. Per l'estrazione del DNA sono stati saggiati i metodi Qiaamp DNA blood minikit (Qiagen), High Pure PCR template preparation kit (Roche), Extracell (Amplimedical) e Nuclisens con sistema semiautomatico Minimag (bioMerieux). Con quest'ultimo abbiamo ottenuto una maggiore sensibilità e lo abbiamo utilizzato per estrarre il DNA da 146 sieri di 37 pazienti ematologici. Successivamente questi sono stati amplificati e rivelati in Real-Time PCR, grazie all'utilizzo di una sonda Taqman, specifica per il genere *Aspergillus*, disegnata, usando il software Primer Express, all'interno di una regione conservata del gene 18S rRNA. Trenta sieri ottenuti da volontari sani, sono stati valutati come controllo. Infine i risultati ottenuti in Real-Time sono stati confrontati con quelli ottenuti con il test del Galattomannano e con i criteri dell'EORTC.

Risultati. Tutti i volontari sani sono risultati negativi. Secondo i criteri EORTC, abbiamo classificato 6 pazienti con 'probabile' Aspergilloso, 20 con "possibile" e 11 con diagnosi "negativa". Il test del Galattomannano (GM) è risultato positivo in 3/6 pazienti con 'probabile' in 2/20 con 'possibile', in 0/11 con nessuna infezione. La RT-PCR è stata positiva in 5/6 'probabili', 9/20 "possibili" e 2/11 con nessuna infezione. In 3/5 pazienti con 'probabile' infezione, la RT-PCR è risultata positiva più precocemente rispetto al GM.

Conclusioni. La RT-PCR per la diagnosi di Aspergilloso invasiva, ha mostrato buona sensibilità e un alto valore predittivo negativo. Soprattutto potrebbe essere un marcatore precoce di infezione fungina, sebbene questi risultati debbano essere confermati su un numero più ampio di pazienti.

165

VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA ALLA CLARITROMICINA MEDIANTE PCR IN PAZIENTI INFETTATI DA *HELICOBACTER PYLORI*

Caldarelli S.R., Verona L., Menin E., Molina V.

CAM, Centro Analisi Monza, Sezione di Microbiologia.

Introduzione. *Helicobacter pylori* (Hp) è un batterio Gram-negativo, microaerofilo, che produce notevoli quantità di urea, difficilmente coltivabile in laboratorio.

L'infezione è diffusa in tutto il mondo, ed è associata a patologie gastro-enteriche acute e croniche, tra cui il carcinoma gastrico.

La terapia farmacologica per l'eradicazione dell'infezione, secondo la Conferenza di Maastricht del 2005, si basa sull'utilizzo di claritromicina associata ad amoxicillina. Purtroppo, esiste una resistenza diffusa alla claritromicina, con percentuale variabile nei diversi Paesi, che non supera il 20% in Italia.

Generalmente la diagnosi di infezione viene effettuata mediante indagini sierologiche e/o Breath test e poi confermata da analisi della biopsia gastrica, senza quindi che venga effettuato un antibiogramma.

Metodi. Lo scopo di questa ricerca è quindi di mettere a punto una metodica diagnostica semplice, non invasiva e poco costosa, per la diagnosi di infezione da Hp e per la ricerca della resistenza alla claritromicina. Questa è dovuta a mutazioni puntiformi di due nucleotidi adiacenti nella regione conservata 23S rRNA.

Abbiamo messo a punto una PCR che amplifica la regione 23S rRNA su campioni di feci, da cui è stato estratto preliminarmente il DNA.

L'estrazione di DNA si è rivelata inizialmente abbastanza difficoltosa per la presenza di diverse sostanze inibitrici e per verificarne la qualità abbiamo utilizzato il gene APC come controllo interno di PCR.

Risultati. I risultati ottenuti dimostrano un'alta percentuale di pazienti resistenti alla claritromicina (37%) rispetto ai dati presenti in letteratura.

Conclusioni. In definitiva, la PCR per la regione 23S rRNA potrebbe essere utilizzata sia per la diagnosi di infezione che per l'analisi della presenza di resistenza alla claritromicina.

166

FREQUENZA DEL GENOTIPO 4 DI HCV IN CALABRIA

Liberto M.C.¹, Barreca G.S.¹, Quirino A.¹, Capicotto R.¹,
Lamberti A.G.¹, Vinci M.¹, Di Cello C.¹, De Rosa M.²,
Silva A.M.², Giraldo C.³, Greco F.³, Matera G.¹, Focà A.¹

¹Cattedra di Microbiologia, Università "Magna Græcia" di Catanzaro;

²Laboratorio di Virologia, A. O. B.M.M. di Reggio Calabria;

³Unità Operativa di Virologia, A. O. di Cosenza

Introduzione. HCV ha come caratteristica principale una sostanziale eterogeneità genomica. Ciò determina la presenza di genotipi e sottotipi diversamente distribuiti nel territorio. Scopo del presente studio è stato quello di valutare l'andamento dei genotipi di HCV in Calabria nel periodo compreso tra Marzo 2001 e Aprile 2006 (ultimo aggiornamento maggio 2005).

Metodi. Lo studio è stato condotto in collaborazione tra il Policlinico Universitario "Mater Domini" di Catanzaro, l'A.O. dell'Annunziata di Cosenza e l'A.O. "Bianchi-Melacrino-Morelli" di Reggio Calabria. L'RNA virale è stato estratto da campioni di siero provenienti da 3640 pazienti anti HCV positivi, rivelato mediante RT-PCR (Cobas Amplicor HCV, Roche) e genotipizzato mediante tecnica di ibridazione inversa su supporto solido (Versant HCVgenotipo LiPA, Bayer). Dal 2003 presso l'A.O. di Cosenza la genotipizzazione è stata effettuata tramite sequenziamento del genoma virale (Trugene HCV 5' NC genotyping Kit, Bayer).

Risultati. I genotipi principalmente circolanti in Calabria sono stati: genotipo 1b (46.3%), 2a/2c (19.2%), 3 (9.8%), 4 (5.96%), 1a (5.3%), 2 (5%), 1 (4.6%), 1a/1b (1.6%) e altri genotipi con percentuali inferiori al 1%. Si è registrato un decremento del 7% per i genotipi 1b e 2a/2c ed un incremento del 3.1 % e del 1.5% rispettivamente dei genotipi 3 e 4 rispetto ad uno studio condotto nel quinquennio 1997-2001.

Conclusioni. È stato messo in evidenza che:

- a) sebbene i genotipi 1b e 2a/2c abbiano subito un evidente decremento, rimangono pur sempre quelli maggiormente presenti sul nostro territorio;
- b) l'incremento del genotipo 3 sia dovuto ad un aumento del numero dei tossicodipendenti nella nostra Regione (Ufficio centrale di Statistica-Ministero dell'Interno); e
- c) il genotipo 4 sia tra i genotipi maggiormente circolanti in Calabria diventando il quarto genotipo rispetto al periodo precedentemente esaminato (1997-2001).

167

I TEST MOLECOLARI AD AMPIA LINEARITÀ ED ELEVATA SENSIBILITÀ PER LA DETERMINAZIONE DELLA CARICA VIRALE: CONFRONTO TRA VECCHI E NUOVI METODI

Capobianchi M.R.; Angeletti C.; Lauria F.N.; Amendola A.; Garbuglia A.R.; Solmone M.

Istituto nazionale per le Malattie infettive "L. Spallanzani", Roma

Introduzione. La determinazione della carica virale nelle infezioni da HBV, HCV e HIV-1 con metodi differenti può avere importanti implicazioni cliniche. Esistono vari metodi commerciali per la quantificazione della carica virale di tali virus, differenti per tecnica di rilevamento, sensibilità, range dinamico, regione genomica bersaglio.

Abbiamo confrontato le performance analitiche del metodo COBAS Ampliprep TaqMan (CAP-CTM) (amplificazione di sequenze con Real-Time PCR) con quelle del sistema Versant 3.0 (amplificazione del segnale mediante ibridazione) per HBV, HCV e HIV.

Metodi. Sono stati utilizzati 150 campioni HBV-positivi, stratificati in HBeAg positivi o Anti-HBeAb-positivi; 92 campioni HCV-positivi e 43 campioni HIV-1-positivi. Sono inoltre stati effettuati test con pannelli standard a concentrazione nota.

Risultati. La correlazione tra i risultati ottenuti con i due metodi è elevata per tutti i virus:

HBV: $r=0.9389$, $p<0.001$;

HCV (tutti i genotipi): $r=0.7702$ ($p<0.001$);

genotipi HCV 1-2-3-4: $r=0.721$, $p<0.001$; $r=0.753$, $p<0.001$; $r=0.873$, $p<0.001$ e $r=0.783$, $p<0.001$;

HIV-1: $r=0.9005$, $p<0.001$.

Dall'analisi dei valori medi emerge che per HCV ed HIV i valori ottenuti con CAP/CTM sono più elevati di quelli ottenuti con bDNA, mentre per HBV si osserva l'opposto. L'analisi Bland&Altman indica che le differenze sono maggiori a valori elevati di carica virale. Per tutti e 3 i virus, una quota rilevante di campioni mostra differenze notevoli tra i due metodi (>0.5 Log o >1 Log), che non sembrano genotipo-dipendente.

Conclusioni. Nonostante l'elevata correlazione e l'espressione in unità internazionali, i risultati dei due metodi non sono sempre confrontabili: in genere CAP/CTM mostra maggiore sensibilità e range dinamico più ampio, ma, a valori elevati di carica virale, si evidenzia una sottostima di HBV-DNA e una sovrastima di HIV- ed HCV-RNA.

In considerazione delle differenze evidenziate tra i due metodi, si reputa necessario una più ampia sperimentazione per valutare l'impatto del nuovo metodo sui processi diagnostici e la eventuale influenza sulla decisione clinica.

168

IDENTIFICAZIONE DEI GRUPPI FILOGENETICI IN CEPPI DI ESCHERICHIA COLI ISOLATI DA MATERIALE UMANO DI DIVERSA PROVENIENZA

Caroppo M. S.¹, Kroumova V.¹, Grasso S.¹, Grossini E.¹, Camaggi A.¹, Ticozzi R.², Raimondi A.², Fortina G.¹

¹Azienda "Ospedale Maggiore della Carità" - Novara - Laboratorio Microbiologia e Virologia

²Università degli Studi di Milano

- Dipartimento di Sanità Pubblica - Microbiologia - Virologia

Introduzione. *E. coli* è un commensale intestinale della maggior parte degli animali, uomo compreso. Alcuni ceppi possono causare una grande varietà di malattie, intestinali e non. Analisi filogenetiche hanno mostrato che esistono 4 principali genotipi (A, B1, B2 e D) e che i ceppi extraintestinali più virulenti appartengono più frequentemente ai gruppi B2 e D.

In questo lavoro sono stati esaminati ceppi di *E. coli* isolati da vari distretti dell'organismo, genotipizzandoli con un metodo rapido e semplice che utilizza tre sequenze di DNA quali markers dei diversi gruppi filogenetici (Clermont, 2000).

Metodi. Sono stati analizzati in totale 94 ceppi, isolati dal distretto ematico (25), dalle urine (32), dalle feci (25) e da campioni respiratori (12).

La genotipizzazione è stata eseguita mediante una multiplex PCR che identifica la presenza dei geni *ChuA*, *YjaA* e del frammento di DNA TSPE.C2. In base al pattern di positività per le tre sequenze è possibile classificare i ceppi analizzati nei diversi gruppi filogenetici. Come ceppo di controllo è stato usato *E. coli* O157:H7.

Risultati. L'analisi filogenetica ha mostrato una prevalenza dei genotipi B2 e D nelle emocolture (in entrambi i casi il 32% dei ceppi), a fronte di una maggior frequenza del genotipo A nelle feci (52%) e nei campioni respiratori (66%). Nei campioni urinari i genotipi più rappresentati sono risultati il B2 (56%) e l'A (31%).

Conclusioni. In accordo con la letteratura i genotipi B2 e D sono risultati più frequenti tra i ceppi virulenti extra-intestinali. L'analisi delle percentuali di ritrovamento dei genotipi patogeni nei vari materiali sembrerebbe suggerire che il passaggio al circolo ematico avvenga a partire dal distretto urinario per quanto riguarda i ceppi di gruppo B2 e dal distretto intestinale per i ceppi di gruppo D.

169

DETERMINAZIONE DEL DNA BATTERICO PER LO STUDIO DELLE INFEZIONI SUBCLINICHE IN PAZIENTI EMODIALIZZATI

Cazzavillan S.¹, Ratanarat R.³, de Cal M.³, Segala C.¹, Corradi V.³, D'Amore EGS.¹, Ronco C.³, Rassu M.²

¹U.O. Anatomia Patologica,

²U.O. Microbiologia e Virologia,

³U.O. Nefrologia, Ospedale San Bortolo, Via Rodolfi, 36100 Vicenza, Italia.

Introduzione. L'infiammazione è una causa importante di malattia/mortalità in pazienti dializzati (pz HD); tra le cause di infiammazione è stata proposta l'infezione subclinica. Scopo di questo lavoro è di correlare i markers infiammatori in pz HD e valutare la presenza di DNA batterico (bDNA).

Metodi. In 81 pz HD (59M/22F, età media 62), sono stati misurati i parametri di infiammazione e deregolazione immunitaria riportati in tabella e l'emocoltura. I pz HD sono stati divisi in GrpA (43) con cause note di infiammazione e GrpB (38) senza cause note. I risultati sono stati analizzati con t-test. Nel GrpB (29M/9F, età media 59) abbiamo valutato la presenza di bDNA (rRNA16S) mediante amplificazione e sequenza, nel sangue intero (WB), dialisato (SD) e nel filtro (compartimento sangue [BL] e dialisato [DIA]).

Risultati. Tutti gli 81 pz presentavano emocolture negative. Nel GrpB, 34/38 pz presentavano IL-6 e MFI aumentati e bDNA+ in almeno un campione. È stato riscontrato bDNA sia di batteri infettanti l'uomo che di ambientali indifferentemente nel BL e DIA. I risultati dei parametri di infiammazione sono riportati in tab 1, quelli del bDNA in tab 2.

Conclusioni. Il dato molecolare è risultato più sensibile dell'emocoltura nell'identificazione di infezioni subcliniche. La correlazione del bDNA+ con i markers infiammatori ha evidenziato nel GrpB un aumento di IL-6 e AOPP, e una diminuzione di MFI, indici di una infiammazione indotta da bDNA (citochine proinfiammatorie) e di deplezione del sistema immunitario. La determinazione del bDNA in BL e DIA è stata più efficace indicando che la membrana funge da concentratore per gli acidi nucleici. I nostri dati indicano che il bDNA può attraversare la membrana del filtro di dialisi inducendo infiammazione.

Population	markers di infiammazione/cytokine			Deregolazione immunitaria			Stress ossidativo		
	HsCRP (mg/dl)	IL-6 (pg/ml)	Albumin (g/dl)	AOPP (μM/l)	GSH (μmol/10 ⁶ cells)	RCOs (nmol/mg prot)	Apoptosis (plasma on U937 cells at 96 hr) (%)	Medium Fluorescence Intensity DR+ (MFI)	% monocytes HLA-DR+
Total (81)	1.06 ± 1.21	17.56 ± 27.34	3.86 ± 0.43	237.63 ± 136.67	5.04 ± 1.06	1.00 ± 0.56	45.14 ± 0.07	99.2 ± 40.46	96.47 ± 3.83
GrpA (43)	1.11 ± 1.27	11.08 ± 11.44	3.80 ± 0.46	217.05 ± 117.85	4.93 ± 1.08	0.99 ± 0.28	46.77 ± 0.07	91.63 ± 42.16	95.86 ± 3.97
GrpB (38)	0.99 ± 1.16	24.73 ± 36.75	3.93 ± 0.40	260.93 ± 153.51	5.17 ± 1.03	1.00 ± 0.76	44.42 ± 0.07	107.76 ± 37.14	97.17 ± 3.59
	ns	P=0.034	ns	ns	ns	ns	ns	P=0.073	ns

Tabella 1

GrpB	markers di infiammazione/cytokine			Deregolazione immunitaria			Stress ossidativo		
	HsCRP (mg/dl)	IL-6 (pg/ml)	Albumin (g/dl)	AOPP (μM/l)	GSH (μmol/10 ⁶ cells)	RCOs (nmol/mg prot)	Apoptosis (plasma on U937 cells at 96 hr) (%)	Medium Fluorescence Intensity DR+ (MFI)	% monocytes HLA-DR+
bDNA + (34)	1.06	26.41	3.93	273.62	5.17	1.0	45	103.44	97.1
bDNA - (4)	0.3	10.3	3.87	153.02	5.16	1.03	41	144.36	98.5

Tabella 2

170

NEUROBORRELIOSI DI LYME E MALATTIA DI PARKINSON: STUDIO DI UN CASO POST-MORTEM

Cazzavillan S.¹, Segala C.¹, D'Amore EGS.¹, Bonoldi E.¹, Rassu M.²

¹U.O. Anatomia Patologica,

²U.O. Microbiologia e Virologia, Ospedale San Bortolo, Via Rodolfi, 36100 Vicenza, Italia.

Introduzione. La borreliosi di Lyme è un'infezione multisistemica trasmessa dalla zecca (*Ixodes*) e causata dalla spirocheta *Borrelia burgdorferi sensu latu* (BB) che provoca patologie cutanee, e, se non trattata, cardiache, reumatologiche e neurologiche. Questa infezione è endemica nell'area del tri-veneto. La neuroborreliosi di Lyme (LN) è molto rara e la sintomatologia può a volte essere confusa con la malattia di Parkinson (PD) o altre patologie neurodegenerative.

Metodi. Da un paziente (anni 57 M) con diagnosi clinica di PD deceduto per polmonite sono stati effettuati prelievi autopsici da corteccia cerebrale, cervelletto, ponte, nervo ottico, poligono di Willis, arteria coronaria, aorta toracica e addominale e arteria renale. I prelievi sono stati divisi in 2 parti, per l'estrazione e amplificazione del DNA (nested-PCR) e per PCR in situ. È stata ricercata una sequenza conservata del gene codificante per la flagellina di BB. Come controllo è stato utilizzato un ceppo di BB ATCC. Gli amplificati sono stati sequenziati per conferma.

Risultati. Tutti i campioni, ad esclusione del poligono di Willis, sono risultati positivi all'amplificazione sia in provetta che in situ. La sequenza ha confermato la provenienza del DNA da BB.

Conclusioni. Il paziente ha evidenziato la presenza di una infezione sistemica da BB e quindi potrebbe presumibilmente avere sviluppato una LN con sintomatologia analoga a quella associata al PD. Da questo studio emerge l'utilità di una valutazione sierologica e molecolare per la determinazione della presenza di BB in caso di sospetto di patologia neurodegenerativa non altrimenti spiegabile.

171

REAL-TIME PCR PER LA RICERCA DI HCV RNA NEL PLASMA.

Cerutti F.³, Allice T.¹, Gabella S.¹, Pittaluga F.¹, Varetto S.¹; Giliberto G.¹; Martelli S.¹; Smedile A.²; Ghisetti V.¹; Marchiaro G.¹.

¹S.C. Microbiologia, Ospedale Molinette, C.so Bramante 88/90, 10126 Torino.

²Dip. Gastroenterologia, Ospedale Molinette, C.so Bramante 88/90, 10126 Torino.

³Università di Torino.

Introduzione. La strategia terapeutica per i pazienti con epatite cronica HCV-correlata è basata sulla quantizzazione di HCV-RNA prima, durante e dopo la terapia. Sono disponibili in commercio diversi test qualitativi e quantitativi basati sulla reazione di RT-PCR end-point e sulla tecnologia del DNA

ramificato (bDNA), differenti per sensibilità e range dinamico. Inoltre, in tutti questi test la fase di estrazione dell'RNA virale manca di sufficiente standardizzazione. Scopo di questo lavoro è confrontare la quantizzazione di HCV-RNA mediante bDNA (VERSANT 3.0, Bayer) con il sistema completamente automatizzato COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM, Roche) che consiste di due moduli: l'estrazione automatizzata dell'RNA da plasma/siero e la Real-Time-PCR.

Metodi. Validazione analitica su un pannello di performance a concentrazione nota; validazione clinica su 151 plasmi di pazienti anti-HCV positivi e testati per HCV-RNA con bDNA.

Risultati. La validazione analitica ha dimostrato una buona correlazione tra valori attesi e valori osservati con CAP/CTM, su un range dinamico di 7 Logs. La validazione clinica ha evidenziato una buona correlazione tra i due metodi ($r=0,919$, $95\%CI=0,89\div0,94$) e una differenza media di quantizzazione con una leggera sottostima da parte di CAP/CTM (Differenza media \pm SD= $-0,31\pm0,43$ LogIU/ml).

La valutazione in rapporto al genotipo (1÷4) conferma una buona correlazione tra bDNA e CAP/CTM ($0,87<r<0,96$); nei genotipi 1÷3 la differenza media dei valori ottenuti tra i due sistemi era di circa 0.3 log, mentre per il genotipo 4 è risultata minima ($0,014\pm0,24$). Per via della diversa sensibilità dei due sistemi (bDNA 615 UI/ml e CAP/CTM 15 UI/ml), il 71% dei campioni negativi con bDNA erano positivi con CAP/CTM, con valori compresi tra $1,6\div3,7$ Log IU/ml.

Conclusioni. Il sistema CAP/CTM consente di quantizzare HCV-RNA su un ampio range dinamico, in modo rapido, accurato e con una eccellente sensibilità, con efficienza simile per i vari genotipi virali. Permangono differenze nella quantizzazione rispetto al metodo del bDNA che necessitano di ulteriori analisi.

172

INFEZIONE DA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN ABKAZIA: STUDIO SULL'INSORGENZA DELLE FARMACO RESISTENZE

D'Amato V.¹, Meacci F.¹, Costa C.¹, Pardini M.², Fattorini L.², Orefici G.², Varaine F.³, Bonnet M.⁴, Jarosz T.⁵, Orrù G.⁶, Isola D.⁶, Niemann S.⁷, Rüsch-Gerdes S.⁷, Rinder H.⁸, Yesilkaya H.⁹, Barer M.⁹, Andrew P.W.⁹, Oggioni M.R.¹

¹LAMMB, Dip. Biologia Molecolare, Policlinico Le Scotte Università di Siena, Italia;

²Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia;

³Médecins Sans Frontières, Parigi, Francia;

⁴Epicentre, Parigi, Francia;

⁵3Es, Parigi, Francia;

⁶Università di Cagliari, Italia;

⁷FZ Borstel, Germania;

⁸LGL Oberschleißheim Germania;

⁹University of Leicester, UK.

Introduzione. Il progetto LONG-DRUG è uno studio longitudinale, supportato dalla Comunità Europea e realizzato in Abkazia, un'area di alta prevalenza di tubercolosi multi-resistente (MDR-TB). L'obiettivo principale è la caratterizzazione molecolare delle farmaco-resistenze in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), il chiarimento della relazione epidemiologica dei cloni identificati, e la delucidazione della rilevanza clinica delle sotto-popolazioni resistenti di MTB.

Metodi. La caratterizzazione di campioni e isolati è effettua-

ta determinando la suscettibilità verso i farmaci di prima e di seconda scelta, il genotipo di resistenza tramite real time PCR, RFLP-PCR e sequenziamento e tipizzando i ceppi mediante IS-RFLP e spoligotyping. I dati sono raccolti in un database accessibile a tutti i partecipanti al progetto.

Risultati. In tre anni di studio sono stati raccolti circa 700 campioni di escreato e isolati quasi 600 ceppi di MTB, di cui 307 sono isolati seriali da 89 pazienti. Ceppi MDR sono stati rilevati in più del 20% dei pazienti. Circa la metà dei ceppi è raggruppata in cluster con identico fingerprint e spoligotype. L'analisi dei polimorfismi nucleotidici mediante real time PCR ha evidenziato la presenza di una batterica popolazione mista, wild type e mutata per alcuni marker di resistenza, nel 51% dei pazienti (34/66). La presenza di popolazioni batteriche eteroresistenti è stata confermata con tre tecniche molecolari indipendenti su campioni prelevati in duplicato e analizzati in sedi diverse.

Conclusioni. L'analisi statistica e la valutazione del significato clinico dei dati ottenuti sono attualmente in corso.

173

QUANTIZZAZIONE DI HBV-DNA IN REAL-TIME PCR: COBAS AMPLIPREP™/COBAS TAQMAN™ HBV TEST.

De Masi A.¹; Cerutti F.¹; Allice T.²; Pittaluga F.²; Varetto S.²; Martelli S.²; Giliberto G.²; Gabella S.²; Marzano A.³; Colucci G.⁴; Ghisetti V.²; Marchiaro G.².

¹Università degli studi di Torino.

²S.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino, c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

³Dipartimento di Gastroenterologia, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino, c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

⁴Roche Molecular Systems, Rotkreuz, Switzerland.

Introduzione. Il successo della terapia antivirale per l'epatite cronica HBV-correlata richiede l'utilizzo di test altamente sensibili basati sulla Polymerase-Chain-Reaction (PCR) per l'identificazione di HBV-DNA. Nel presente lavoro si è valutata la performance del sistema Real-Time-PCR COBAS AmpliPrep™/COBAS TaqMan™ 48 (CAP/CTM, Roche) confrontato con il sistema semi-automatico in PCR end-point COBAS AMPLICOR HBV Monitor (CAHBM, Roche).

Materiali. Validazione analitica di CAP/CTM su un pannello di 12 standards di HBV-DNA con un titolo compreso tra 2 e 10⁹ IU/ml (AcroMetrix). Validazione clinica su 92 campioni di plasma da pazienti HbsAg-positivi, 11 dei quali in trattamento combinato Lamivudina(LAM) e Adefovir(ADF) (5 pazienti) e in monoterapia con ADF (6 pazienti).

Risultati. La validazione analitica di CAP/CTM ha mostrato una stretta correlazione tra valori attesi e valori osservati (r=0.976), una sensibilità del 100% a 54 IU/ml e range dinamico di 8 logaritmi. La validazione clinica ha evidenziato un'ottima correlazione con CAHBM (r=0.966, differenza media di 0.36 log₁₀ IU/ml tra i due metodi); il 10% di pazienti HBV-DNA CAHBM-negativi sono risultati CAP/CTM-positivi e, nei pazienti in terapia, il metodo in Real-Time ha evidenziato le viremie residue per un tempo maggiore. La terapia di combinazione LAM con ADF si è

associata ad una maggiore caduta della viremia dopo 12 mesi di trattamento rispetto alla monoterapia con ADF (5.1 vs 3.5 logaritmi).

Conclusioni. Il nuovo sistema completamente automatizzato CAP/CTM per HBV-DNA ha mostrato performance molto buone, con eccellente sensibilità e ampio range dinamico e può pertanto contribuire al monitoraggio e alla gestione clinica dell'epatite cronica da HBV.

174

MESSA A PUNTO DI UNA NESTED-PCR PER IDENTIFICARE CEPPI DI P. OVALE CON POLIMORFISMO GENETICO NEL 18S-rDNA.

Calderaro A., Piccolo G., Perandin F.¹, Gorrini C., Peruzzi S., Ricci L.², Manca N.¹, Snounou G.³, Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio,

Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma;

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata,

Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia;

²Arcispedale di Reggio Emilia;

³Muséum National d'Histoire Naturelle Parasitologie Comparée et Modèles Expérimentaux (USM 0307) Parigi (Francia).

Introduzione. L'utilizzo di saggi di PCR per la diagnosi di malaria ha evidenziato un aumento della prevalenza in Italia dei casi d'infezione da *P. ovale* (*Po*) sottostimata nel passato mediante microscopia. In precedenza abbiamo descritto la presenza di ceppi di *Po* probabilmente mutati nel 18S-rDNA che possono non essere rivelati dai saggi di PCR basati su questo bersaglio. Qui riportiamo la descrizione di una nuova coppia di primers per l'identificazione di questi ceppi di *Po*. **Metodi.** Centosette campioni di sangue di pazienti con sospetta malaria (microscopia: 9 *P. falciparum* (*Pf*), 12 *P. vivax* (*Pv*), 7 *Po*, 3 *P. malariae* (*Pm*), 1 *Pv/Po*, 2 *P. spp.*, 73 negativi) sono stati sottoposti a 18S-rDNA-PCRs (nested-PCR genere-specifica, nested-PCR-1993, -2002) per *Pf*, *Pv*, *Po* e *Pm*. In questo studio è stata disegnata una nuova coppia di primers (rOVA1B, rOVA2B) (nested-PCR-2005) tenendo conto delle mutazioni osservate in alcuni ceppi di *Po* nella sequenza bersaglio dei primers usati nella nested-PCR-1993. I nuovi primers sono stati valutati su 1 campione positivo per *Pf*, *Pv*, *Pm* rispettivamente e 1 negativo per plasmodi, e utilizzati per verificare la presenza di ceppi di *Po* mutati nei campioni biologici.

Risultati. La nested-PCR-2005 è stata la sola in grado di identificare correttamente *Po* nei 23 campioni di sangue in cui era presente: 20 ottenuti da casi con infezione singola e 3 da casi con infezione mista (2 *Pf+Pm+Po* e 1 *Pf+Po*). La nested-PCR-1993 e la nested-PCR-2002 hanno identificato 14 e 17 ceppi di *Po*, rispettivamente.

Conclusioni. Una corretta diagnosi di laboratorio di malaria non può prescindere dall'impiego combinato dell'esame microscopico e di appropriati metodi molecolari. I risultati ottenuti nel nostro studio indicano che alcune infezioni da *Po* possono essere non diagnosticate non solo dall'esame microscopico ma anche da alcuni saggi di PCR aventi come bersaglio il gene 18S-rDNA a causa della presenza di un polimorfismo genetico presente in questa regione.

175

CONFRONTO TRA SDA E REAL-TIME PCR NELLA DIAGNOSTICA DELLA INFEZIONE DA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*: STUDIO PRELIMINARE

¹Di Taranto A., ²Del Prete R., ¹De Nittis R., ¹Antonetti R.,
²Miragliotta G.

¹Laboratorio di Microbiologia,
Azienda Ospedaliera-Universitaria OORR, Viale Pinto, 71 100-Foggia
²Sezione di Microbiologia, Dip. MIDIM, Università degli Studi,
Policlinico, P.zza G. Cesare, 4, 70124-Bari.

Introduzione. *Chlamydia trachomatis* è attualmente responsabile di una delle infezioni a trasmissione sessuale (STD) più diffuse. Nel sesso femminile la sua prevalenza cade nell'età compresa tra 18 e 24 anni e nel 70-80% dei casi decorre in maniera paucisintomatica. Ciò implica sottostima della diffusione reale della infezione e possibile evoluzione in Malattia Infiammatoria Pelvica (PID) con conseguenti sterilità e gravidanze ectopiche. L'introduzione in diagnostica dei NAATs (Nucleic Acid Amplification Tests) hanno permesso di controllare la diffusione della infezione. Scopo del nostro lavoro è quello di confrontare due metodiche di amplificazione genica, Strand Displacement Amplification (SDA) e Real-Time PCR, su campioni provenienti da popolazione di sesso femminile e maschile.

Materiali e Metodi. Dal 1° Settembre al 30 Novembre 2005 sono stati esaminati 67 campioni clinici di cui 59 tamponi endocervicali (8 da gravide) e 8 urine (da sesso maschile) provenienti da pazienti ambulatoriali (1 tampone endocervicale da pz. ricoverata) di età compresa tra 22 e 58 anni afferenti all'ambulatorio di Microbiologia degli OO.RR. Foggia per sintomatologia riferibile a infezione delle vie uro-genitali. I campioni clinici sono stati saggiati contemporaneamente con metodiche molecolari, SDA (Becton & Dickinson, BD, USA) e Real-Time PCR (RealArt™ *C. trachomatis* Plus, Artus-Biotech, Germany) dopo estrazione del DNA mediante sistema automatizzato (Qiagen, Germany).

Risultati. 3/59 tamponi endocervicali sono risultati positivi sia a SDA sia a Real-Time PCR. 1/8 campioni urinari provenienti dal sesso maschile, è risultato positivo sia a SDA sia a Real-Time PCR. 7/8 campioni urinari sono risultati indeterminati a SDA e negativi a Real-Time PCR.

Conclusioni. I dati preliminari ci permettono di affermare che la Real-Time PCR dimostra avere una notevole precisione diagnostica sia come tecnica di screening sia nella conferma della infezione da *Chlamydia trachomatis*. Inoltre, i risultati indeterminati ottenuti dalla tecnica SDA potrebbero essere dovuti all'utilizzazione delle urine che, per la presenza di inibitori, sono considerati campioni "difficili".

176

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ISOLATI IN ITALIA

Filetici E., Owczarek S., Luzzi I., Dionisi A.M.

Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

Introduzione. *Yersinia enterocolitica* è l'unica specie del

genere *Yersinia* responsabile di gastroenteriti nell'uomo; è ampiamente diffusa in natura e il principale serbatoio è rappresentato dai suini; l'infezione viene prevalentemente contratta attraverso il consumo di carni suine contaminate ed è di tipo sporadico, anche se non mancano descrizioni di episodi epidemici. La maggior parte dei ceppi isolati da fonte non umana risultano non tipizzabili ed è necessario utilizzare tecniche di tipizzazione molecolare che consentano lo studio del DNA.

La frequenza di isolamento di *Y. enterocolitica* in casi umani di gastroenterite in Italia è piuttosto bassa, tuttavia il microrganismo viene ricercato e ritrovato frequentemente negli alimenti di origine animale e nei vegetali. Scopo della nostra ricerca è stato quello di analizzare ceppi di *Y. enterocolitica* isolati da diverse fonti mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE), al fine di verificare la capacità discriminante di questa tecnica e di creare una collezione di profili elettroforetici di ceppi attualmente circolanti nel nostro Paese.

Metodi. Sono stati analizzati 70 ceppi di *Y. enterocolitica* isolati da alimento, da animale, da uomo negli anni 2004-2005. Su tutti i ceppi è stata eseguita sierotipizzazione, determinazione della sensibilità agli antibiotici e PFGE.

Risultati. L'analisi mediante PFGE ha prodotto 66 profili elettroforetici diversi per 69 ceppi non correlati epidemiologicamente (potere discriminante > 98%) rilevando profili diversi anche all'interno dello stesso sierotipo. Solo per 2 ceppi isolati da infezione umana correlati temporalmente e geograficamente sono stati ottenuti profili elettroforetici identici.

Conclusioni. La PFGE si dimostra una tecnica di tipizzazione valida anche per *Y. enterocolitica* utilizzabile a supporto degli studi epidemiologici; è inoltre uno strumento di tipizzazione indispensabile per i ceppi non sierotipizzabili isolati da varie fonti alimentari di cui ancora è sconosciuto il ruolo nelle infezioni umane.

177

METODI MOLECOLARI A CONFRONTO PER LA TIPIZZAZIONE DI HCV-RNA

Gabella S., Alice T.; Varetto S., Pittaluga F., Ghisetti V., Marchiaro G.

S.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino, c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

Introduzione. La tipizzazione di HCV ha valore prognostico in quanto predice la risposta alla terapia ma anche epidemiologico perché consente di valutare la diffusione del virus fornendo uno strumento importante per il controllo di cluster epidemici a livello nosocomiale. Scopo di questo lavoro è valutare il ruolo del sequenziamento diretto di regioni genomiche diversamente variabili di HCV per la tipizzazione di HCV a livello di genotipo e in particolare di sottotipo. Il sequenziamento viene confrontato con il test di ibridazione inversa line-probe-assay (LiPA).

Metodi. 70 campioni di siero da pazienti HCV-positivi e appartenenti ai genotipi 1-5 secondo LiPA sono stati sottoposti al sequenziamento diretto della regione genomica 5'UTR (5'UTR-Seq). Su 21 campioni (12 5'UTR-Seq-negativi) si è proceduto al sequenziamento diretto della regione NS5b (NS5b-Seq). Per l'analisi filogenetica sono state selezionate sequenze di riferimento rispettivamente per le regio-

ni 5'UTR (n=71) e NS5b (n=30); BioEdit 7.0.0 e ClustalW sono stati utilizzati per l'allineamento delle sequenze dei campioni con quelle di riferimento.

Risultati. 5'UTR-Seq ha consentito di tipizzare il 66% (46/70) dei campioni LiPA-positivi. Dal confronto 5'UTR-Seq *versus* LiPA, 40 campioni su 46 (87%) sono risultati concordanti per genotipo e 32 su 40 (80%) concordanti per sottotipo. Dei 12 campioni 5'UTR-Seq-negativi, 8 sono stati tipizzati mediante NS5b-Seq. Tutti i genotipi individuati con NS5b-Seq sono risultati concordanti con quelli ottenuti con LiPA. Il sequenziamento delle regioni 5'UTR e NS5b ha consentito l'attribuzione di un unico sottotipo nei casi in cui LiPA non consentiva la determinazione del sottotipo, come per i genotipi 1,2 e 4. L'utilizzo combinato del sequenziamento di 5'UTR e NS5b ha permesso di tipizzare l'81% dei campioni LiPA-positivi.

Conclusioni. Questo studio evidenzia la necessità di utilizzare il sequenziamento diretto di almeno due regioni genomiche con differente livello di variabilità genetica per la tipizzazione del virus a scopo epidemiologico e clinico.

178

CASI DI AMEBIASI A PARMA NEL PERIODO 2003-2006

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. L'identificazione di *Entamoeba histolytica*, agente eziologico di amebiasi, è importante per una corretta diagnosi e una terapia mirata. *E. histolytica* non è morfologicamente differenziabile da *E. dispar*, non patogena; pertanto, sono necessari metodi molecolari per distinguerle. Nel presente studio riportiamo i casi di amebiasi e di infezione da *E. dispar* diagnosticati nel nostro laboratorio nel periodo 2003-2006 mediante metodi molecolari (PCR convenzionale e real-time) affiancati a quelli tradizionali.

Metodi. I campioni di feci (5647) e/o liquido aspirato da ascesso epatico (11) (appartenenti a 1886 pazienti con sospetta parassitosi intestinale) sono stati sottoposti ad esame macroscopico, microscopico ed esame colturale per protozoi e nematodi intestinali. Dai campioni appartenenti a pazienti che presentavano sospetto clinico e/o fattori di rischio per amebiasi è stato inoltre estratto il DNA e sottoposto a PCR (convenzionale e real-time) per l'identificazione di *E. histolytica* e *E. dispar*.

Risultati. Nel periodo 2003-2006 sono stati diagnosticati nel nostro laboratorio 18 casi (0.95%) di infezione da *E. dispar* e 10 casi (0.53%) di amebiasi (5 di amebiasi extraintestinale e 5 di dissenteria amebica).

Discussione. L'applicazione dei saggi di PCR, affiancati ai metodi tradizionali, si è rivelata indispensabile per una diagnosi accurata consentendo di instaurare prontamente una terapia mirata nei 5 pazienti con amebiasi extraintestinale, evitando un decorso clinico infausto. I saggi di PCR si sono rivelati più sensibili e specifici dei metodi tradizionali: in mancanza dei saggi molecolari, 5 dei 10 casi di amebiasi non sarebbero stati diagnosticati poiché negativi alle indagini tradizionali. Inoltre, i saggi di PCR si sono dimostrati utili per ottenere informazioni riguardanti l'epidemiologia delle infezioni da *E. histolytica* in un paese non endemico quale

l'Italia, permettendoci di comprendere come l'amebiasi non sia limitata a soggetti immigrati, adottati o che abbiano viaggiato in zone endemiche, ma sia presente anche in italiani apparentemente privi di fattori di rischio.

179

CONFRONTO TRA I METODI TRADIZIONALI FENOTIPICI ED IL SEQUENZIAMENTO DEL GENE 16S rRNA PER L'IDENTIFICAZIONE DEI BATTERI

Arosio M., Raglio A., Nozza F., Vailati F., Passera M., Grigis A., Goglio A.

USC Microbiologia e Virologia,
A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo, Largo Barozzi 1, 24128 Bergamo

Introduzione. Lo scopo del presente lavoro è stato di valutare, nella realtà di un laboratorio ospedaliero di Microbiologia, la performance e le indicazioni all'identificazione dei microrganismi tramite sequenziamento del genoma batterico in confronto ai tradizionali metodi fenotipici.

Metodi. Nella nostra routine diagnostica le metodiche adottate prevedono la colorazione al Gram e le indagini manuali e/o automatizzate (gallerie API - VITEK 2, bioMérieux). L'esame molecolare è stato effettuato utilizzando il Kit MicroSeq 500 (*Applied Biosystems*), eseguendo la fase di estrazione, amplificazione tramite PCR e sequenziamento del gene 16S rRNA, in accordo alle indicazioni della ditta. Per l'identificazione delle sequenze è stato utilizzato il database di GenBank (BLAST) confrontando in alcuni casi i risultati ottenuti con quelli del MicroSeq ID Analysis Software (*Applied Biosystems*). Un'identità della sequenza 16S rRNA >99% è stato il criterio adottato per identificare un isolato a livello di specie e tra 97-99% a livello di genere.

Risultati. Sono stati esaminati 75 microrganismi: 23 bacilli Gram negativi non fermentanti, 5 stafilococchi, 20 streptococchi α -emolitici, 2 enterococchi, 4 esigenti, 9 vari, 9 micobatteri e 3 miceti, isolati da campioni biologici che presentavano difficoltà all'identificazione con i metodi tradizionali. Si è giunti ad una identificazione di specie in 67 casi (89.3%) con il kit MicroSeq 500 e soltanto in 31 (41.3%) con le metodiche convenzionali (X^2 , $p < 0.05$) ai quali si aggiungono 27 isolati (36%) che hanno riportato un'identificazione di genere mentre 17 (22.7%) nessuna identificazione. In 8 casi (10.7%) è stato possibile trovare soltanto un'omologia delle sequenze che soddisfacesse i criteri per l'identificazione di genere. I nostri dati mostrano inoltre una performance inferiore nei confronti degli streptococchi α -emolitici per quanto significativamente più elevata dei sistemi tradizionali (75% vs 40%).

Conclusioni. Il sequenziamento del gene 16S rRNA ha permesso una corretta e rapida identificazione della maggior parte dei microrganismi isolati (89.3%). L'utilizzo del software riduce ulteriormente i tempi di identificazione, confrontando direttamente le sequenze in esame all'interno di un database controllato anche se meno completo di quello disponibile nelle banche dati pubbliche come GenBank. La recente disponibilità del kit MicroSeq FullGene (1500 bp) potrebbe migliorare la performance di questa procedura. Un aspetto non trascurabile sono i costi contenuti del kit MicroSeq 500 che lo rende facilmente applicabile nei laboratori di Microbiologia con esperienza nell'utilizzo delle indagini molecolari.

180

FUSARIOSI DISSEMINATA IN UN PAZIENTE IMMUNOCOMPROMESSO

Leo L.¹, Musio K.¹, D'Aversa P.¹, Rana A.², Greco G.², De Francesco R.², Pavone V.²

¹Sez. Microbiologia, U.O. Medicina di Laboratorio

²Rep. Ematologia, A.O. "Pia Fondazione di Culto e Religione Card. Panico", v. Pio X, Tricase (Le)

Introduzione. Il micete ialino *Fusarium solani* (*Fs*), considerato un comune contaminante, sporadicamente può causare infezioni profonde in pazienti immunocompetenti ed infezioni sistemiche in pazienti immunocompromessi. In questo studio *Fs* è stato isolato da un paziente affetto da leucemia mieloide acuta, dapprima da un tampone nasale di controllo e dopo due settimane da una sua emocoltura positiva. Il paziente, con malattia refrattaria in progressione, al momento dell'infezione da *Fs* era in stato di neutropenia di grado 4 (<500 neutrofili) e in profilassi antifungina con itraconazolo per os. La comparsa di lesioni nodulari cutanee associate ad emocolture positive per *Fs*, ha suggerito un quadro clinico di infezione disseminata.

Metodi. L'isolamento primario è stato effettuato su agar destrosio Sabouraud incubato a 30°C per 3-7 giorni e su flaconi di emocoltura (Bact/Alert, Bioré) incubati a 35°C per 7 giorni. Successivamente una coltura pura ottenuta da singolo tipo ifale è stata inoculata su agar patata destrosio (PDA) incubato a 25°C. Per confermare l'identificazione fenotipica, il DNA, amplificato per PCR, è stato sottoposto ad analisi di sequenza.

Risultati. Su PDA le colonie (a rapida crescita) presentavano micelio cotonoso, color bruno chiaro. Microscopicamente si osservavano ife ialine e settate, numerosi microconidi ovali o fusiformi, con 1 o 2 celle, su corte e strette filidi, macroconidi arcuati con 3-5 celle, clamidoconidi globosi singoli o in coppia. Il DNA dell'isolato sequenziato e comparato con sequenze di DNA mediante allineamento in BLAST ha mostrato il 100% di omologia con *Fs*. L'accession number dell'isolato è DQ535185.

Conclusioni. Nei miceti filamentosi la diagnosi di specie, spesso difficoltosa per la notevole variabilità fenotipica degli isolati, oltre che un valore epidemiologico assume a volte rilevanza terapeutica. Pertanto in questo studio l'identificazione morfologica macroscopica e microscopica di *Fs*, è stata confermata dai risultati dell'analisi di sequenza.

181

LA TM-REAL TIME SYBR GREEN PCR PER LA DISCRIMINAZIONE RAPIDA DEI GENOTIPI HPV A BASSO RISCHIO

Leo G.^o, Pisanò M.^o, Pitotti E.^o, Ciannamea B.^{oo}, Megha M.^{oo}, Spedicato S.*^o, Storelli F.*^o, Vergara D.*^o, Moschettini G.*^o, ze Tinelli A.^{ooo}.

^(o)U.O. Biol. Mol. e Oncol. Sperim., P. Oncologico "Vito Fazzi" AUSL/LEI P.zza Muratore 73100 Lecce;

^(oo)U.O. Microb. e Virol. AUSL/LEI P. Bottazzi 73100 Lecce;

^(*)Dip.Sc.eTecn.Biol.eAmbien. (DiTeBA) Università degli Studi di Lecce strada provinc. Lecce-Monteroni 73100 Lecce;

^(ooo)U.O. Ginecol. Ospedale "Vito Fazzi" AUSL/LEI P.zza Muratore 73100 Lecce.

Introduzione. La diagnosi dell'infezione da HPV si basa

sull'analisi molecolare mediante PCR delle ORF L1 ed E6/E7. Numerose metodiche sfruttano l'analisi delle differenze delle sequenze nucleotidiche di queste regioni per discriminare i diversi genotipi virali. Scopo del lavoro è mettere a punto un sistema rapido di indagine che impiega l'analisi delle differenze esistenti in termini di percentuale C+G nelle ORF L1 dei tipi virali di HPV, per la rivelazione e genotipizzazione dell'infezione da papillomavirus mediante l'analisi delle curve di melting degli amplificati.

Metodi. Il DNA virale è stato purificato da 50 campioni provenienti da *scrape* cervicale, amplificato mediante i primer MY09 e MY11 e i prodotti sequenziati tramite un sequenziatore ABI Prism 310 (Applied Biosystem). I risultati sono stati confrontati con le sequenze in banca dati. L'analisi delle curve di melting è stata condotta con il fluoroforo SYBR Green in un sistema PCR Real Time (Roche).

Risultati. I virus genotipizzati tramite sequenziamento sono stati analizzati con PCR Real Time in modo da poter associare a ciascun genotipo una *Temperatura di melting* (*Tm*) caratteristica. Allo scopo, oltre al contenuto in CG, sono state determinate le opportune condizioni sperimentali per eseguire le indagini. Si è quindi testato il protocollo conducendo l'analisi su campioni incogniti. I risultati più significativi si sono ottenuti per l'identificazione dei genotipi HPV16 e 18 e HPV6 e 11, dove all'analisi delle *Tm* si riscontra una differenza maggiore di un grado tra i genotipi ad alto rischio (81,28°C ± 0.29 S.D.) e quelli a basso rischio (82,48°C ± 0.27 S.D.) che permette così di discriminare i tipi 6 ed 11 dagli altri.

Conclusioni. Rispetto a metodiche tradizionali la Real Time PCR offre il vantaggio di essere più rapida, molto più sensibile e, con la determinazione delle *Tm*, fornisce indicazioni sui genotipi responsabili dell'infezione da HPV utili per la messa a punto di un protocollo diagnostico per la discriminazione rapida delle infezioni da ceppi a basso rischio.

182

EPISODIO EPIDEMICO DI TOSSINFEZIONE ALIMENTARE ASSOCIATO AD INFEZIONE DA ESCHERICHIA COLI ENTERO-AGGREGATIVO IN UN AGRITURISMO

Staffolani M. (a), Fisichella S. (a), Striano G. (a), Colletta S. (b), Ferri G. (b), Minelli F. (c), Marziano M.L. (c), Scavia G. (c), Caprioli A. (c)

a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Macerata;

b) ASL Civitanova Marche;

c) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Introduzione. *Escherichia coli* entero-aggregativi (EAEC) presentano un particolare profilo di adesione alle cellule in coltura e sono considerati come un gruppo distinto di *E. coli* patogeni. Le infezioni da EAEC sono particolarmente frequenti nei paesi in via di sviluppo dove sono state spesso associate a diarrea protratta; sono invece piuttosto rare nei paesi industrializzati, inclusa l'Italia, dove sono generalmente associate a diarrea acquosa di tipo secretivo di breve durata. Viene qui descritto un episodio di tossinfezione alimentare associato ad infezione da EAEC.

Caso clinico. Nel febbraio 2006, si sono verificati due episodi di tossinfezione (16 febbraio e 26 febbraio) presso un

agriturismo; il primo episodio ha riguardato 14 di 23 comensali (tasso di attacco: 66%), il secondo 16 di 24 (61%). In entrambi la sintomatologia è stata lieve (diarrea in 24 casi, vomito in 15, febbre in 12) e nessun soggetto ha richiesto ospedalizzazione. L'indagine epidemiologica indicava, in entrambi gli episodi, una possibile associazione con il consumo di due tipi di formaggio pecorino prodotto presso lo stesso agriturismo con latte ovino non pastorizzato.

Campioni di feci raccolti da 32 soggetti e da 3 addetti alla preparazione degli alimenti e alla gestione dell'agriturismo risultavano negativi per *Salmonella*, *Shigella*, *Y. enterocolitica* e *Campylobacter*. Ceppi di *E. coli* ottenuti da 13 casi coinvolti nel secondo episodio e dai 3 addetti sono stati esaminati mediante PCR per la presenza di geni di virulenza caratteristici dei principali gruppi patogeni. Da 6 dei 13 casi e da un addetto alla ristorazione è stato isolato *E. coli* entero-aggregativo di sierogruppo O78. Il campionamento di alimenti è stato limitato ai resti del pasto del secondo episodio e ad alcuni alimenti non inclusi nel menù ma conservati nei frigoriferi della cucina. Tutti i campioni sono risultati negativi per la presenza di agenti patogeni comuni (*Salmonella*, *Shigella*, *Y. enterocolitica*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Clostridium perfringens*). I 2 formaggi pecorini presentavano una carica di *E. coli* superiore a 106 CFU/g, anche se l'esame PCR dava esito negativo per la presenza di geni EAEC.

Conclusioni. L'episodio descritto rappresenta la prima segnalazione di un episodio epidemico di infezione da EAEC in Italia e pone il sospetto di un'origine zoonosica di queste infezioni, finora mai ipotizzato.

183

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI MUTAZIONI CONFERENTI RIFAMPICINA E ISONIAZIDE RESISTENZA IN *M. tuberculosis* IN CAMPIONI CLINICI DIRETTI

Miotto P¹, Piana F^{1,2}, Migliori GB³, Penati V², Lacchini C², Cirillo D¹

¹ Unità Batteri Patogeni Emergenti, Istituto Scientifico San Raffaele, via Stamira d'Ancona 20, 20127 Milano

² Istituto Villa Marelli, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Viale Zara 81, 20159, Milano

³WHO collaborating centre FS. Maugeri-Tradate

Introduzione. Data l'importanza dell'individuazione rapida di pazienti infetti da MTB-MDR, obiettivo dello studio è valutare la capacità del test GenoType-MTBDR come strumento di diagnosi rapida di casi MDR in campioni clinici diretti. Per la sorveglianza delle farmacoresistenze su ampia scala, anche in Paesi in cui la coltura non è eseguita in routine, si sta valutando la possibilità di utilizzare un supporto (GenoCard) trasportabile e utilizzabile direttamente in reazione di PCR per determinare farmacoresistenze mediante approccio molecolare.

Metodi. In uno studio prospettico, si sono analizzati 68 campioni clinici diretti con sospetto di TB attiva mediante il test commerciale GT-MTBDR (Hain Lifescience, Nehren, Germany) che sfrutta la tecnologia LiPA e permette la determinazione di rifampicina-isoniazide-resistenza, identificando mutazioni in *rpoB* e *katG*. L'antibiogramma è stato eseguito mediante MGIT.

Risultati. Dei 68 campioni esaminati, 56 hanno fornito un

pattern di amplificazione ed ibridizzazione tale da permettere un giudizio sulla positività per MTB e sul presunto pattern di sensibilità/resistenza visualizzata come ibridizzazione con probe specifici. 12 campioni (11/12 BAAR-negativi) non hanno sviluppato un profilo di amplificazione atteso o interpretabile. Il test ha individuato 3 campioni MDR, tutti confermati dall'antibiogramma. 4 campioni sono stati identificati come isoniazide-resistenti a seguito dell'identificazione della mutazione AGC315ACC in *katG*. Per 10 campioni BAAR-positivi l'esperimento si è rivelato riproducibile utilizzando materiale fissato su GenoCard.

Conclusioni. Il test ha identificato correttamente 3 campioni MDR. La valutazione della sola mutazione S315T in *katG* ha permesso di individuare il 60% dei campioni fenotipicamente isoniazide-resistenti ed è pertanto insufficiente a garantire sensibilità adeguata per rilevare isoniazide-resistenza. Approcci genetici che hanno come target *rpoB* sono invece strumenti utili per l'identificazione rapida di MTB-MDR in popolazioni selezionate. La GenoCard, di facile inattivazione e trasporto, può favorire l'applicazione di tecniche molecolari per la raccolta dati di rifampicina-resistenza in Paesi in cui la coltura non è eseguibile in routine.

184

STUDI CLINICI RELATIVI AI GENOTIPI gN DI CITOMEGALOVIRUS COME DETERMINANTI DI VIRULENZA DEI CEPPI WILD-TYPE

Pignatelli S., Dal Monte P., Camozzi D., Lazzarotto T., Landini M.P.

DMCSS, Sez. Microbiologia, Università di Bologna, via Massarenti 9, 40138 Bologna.

Introduzione. Gli isolati clinici di HCMV presentano caratteristiche immuno-patogenetiche estremamente differenti, pur avendo circa il 90-95% di omologia a livello genomico. L'infezione da HCMV è in grado di originare un ampio spettro di manifestazioni cliniche, potendo il virus infettare numerosi tipi cellulari, con differenti efficienze replicative, stabilendo infezioni persistenti o latenti. Le differenze biologico-comportamentali dei diversi ceppi *wild-type* di HCMV sono state imputate a variazioni all'interno del genoma virale riguardanti *loci* polimorfici ipervariabili, codificanti per *target* immunologici o prodotti fondamentali per la replicazione e l'architettura virale. Tra i geni candidati a *marker* di polimorfismo e patogenicità si annovera UL73, codificante per la glicoproteina gN del complesso immunogeno di *envelope* gC-II, coinvolto nell'*attachment* e *spread* virale. Isolati clinici di HCMV presentano una delle 7 varianti genomiche di gN, denominate gN-1, gN-2, gN-3a, gN-3b, gN-4a, gN-4b, gN-4c.

Metodi. L'ORF UL73 è stata amplificata dal genoma di HCMV mediante *Nested-PCR* e il genotipo gN determinato mediante sequenziamento e/o *RFLP*. Le popolazioni analizzate nel presente lavoro sono state le seguenti: donatori immunocompetenti con infezione latente da HCMV; trapiantati d'organo solido con infezione in atto da HCMV; neonati con infezione congenita da HCMV. Le distribuzioni ottenute sono state confrontate mediante test del chi-quadro, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

Risultati. Il confronto tra le diverse frequenze genotipiche riscontrate suggerisce che il genotipo gN-1 possa essere caratterizzato da una ridotta virulenza, mentre le varianti

appartenenti al gruppo gN-4 rappresenterebbero fenotipi maggiormente virulenti. In particolare il gN-4b ed il gN-4c risulterebbero prognostici di manifestazioni cliniche severe dell'infezione da HCMV.

Conclusioni. Gli studi presentati dimostrano come in ambito clinico, nonché nella pratica per la sicurezza del trapianto e trasfusionale, possa risultare importante identificare non solo la presenza del genoma virale, ma anche il ceppo virale di appartenenza, informazione a valore prognostico nel corso del monitoraggio diagnostico e terapeutico del paziente con infezione da HCMV.

185

IDENTIFICAZIONE DI *CANDIDA* SPP. E GRUPPI TASSONOMICI CORRELATI MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DELLA REGIONE D2 DEL GENE CODIFICANTE LA LSU RIBOSOMALE

Putignani L.¹, Paglia M.G.¹, Bordi E.¹, Nebuloso E.¹, Pucillo L.P.¹, Visca P.²

¹Unità di Microbiologia Molecolare, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive I.R.C.C.S. "Lazzaro Spallanzani", Via Portuense 292, 00149 Roma, Italy;

²Dipartimento di Biologia, Università "Roma Tre", Viale G. Marconi 446, 00146 Roma, Italy.

Introduzione. All'interno del Phylum degli Ascomyceti il genere *Candida* rappresenta l'agente patogeno più comunemente diffuso e associato a un quadro diversificato di patologie umane. Recentemente, l'incidenza di infezioni fungine ha subito un incremento considerevole legato ad AIDS, trapianti, trattamenti antineoplastici, utilizzo prolungato di cateteri vascolari. La diagnosi di candidosi rimane tuttora attuale, sia per la complessità della diagnosi clinica che per la difficoltà di una corretta identificazione di alcune specie. Riportiamo i risultati di un metodo, basato sulla divergenza della regione D2 del gene codificante la LSU ribosomale, per la identificazione molecolare di asco- e basidiomiceti da campioni clinici. **Metodi.** Un gruppo di 39 isolati fungini clinici, affiancati da 14 ceppi di riferimento, sono stati identificati seguendo uno schema operativo standard, dal piastramento al referto, sia mediante saggi fenotipici (RapID e API 20C AUX) che attraverso il metodo di genotipizzazione, utilizzando un approccio di PCR/sequenziamento diretto della regione nucleotidica D2. Le sequenze ottenute sono state caratterizzate mediante interrogazione incrociata di banche dati (GenBank e EMBL) ed il potere discriminatorio del locus D2 nell'assegnazione di specie è stato verificato mediante un'analisi filogenetica comparativa che ha incluso le regioni D1/D2 e D2 della LSU.

Risultati. La risoluzione di specie è stata raggiunta per tutti gli isolati di *Candida* spp. e per generi correlati, nonostante il basso potere discriminatorio del locus D2 prescelto. I risultati sono stati confermati da un'analisi filogenetica che ha convalidato l'accuratezza dell'identificazione anche nei casi di fallimento dell'identificazione fenotipica.

Conclusioni. Il protocollo di identificazione genotipica qui presentato si è rivelato valido nell'identificazione veloce e a basso costo di specie fungine. Combinata a saggi fenotipici preliminari, la identificazione su base genetica può migliorare le procedure utilizzate nell'assegnazione tassonomica di specie fungine di rilevante importanza clinica.

186

PRESENZA DI *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* IN CAMPIONI AUTOPTICI CEREBRALI

Cazzavillan S.¹, Segala C.¹, Bevilacqua PA.¹, Bonoldi E.¹, d'Amore EGS.¹, Rattu M.²

¹U.O. Anatomia Patologica,

²U.O. Microbiologia e Virologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italia.

Introduzione. *Chlamydomphila pneumoniae* (CP) causa infezioni respiratorie, ma è correlata anche allo sviluppo di aterosclerosi e malattie neurodegenerative. Esperimenti "in vitro" hanno evidenziato che l'infezione da CP induce la migrazione delle cellule infettate (Polimorfonucleati) attraverso la barriera emato-encefalica determinando modificazione dell'espressione di molecole di adesione ed alterazione dei meccanismi di trasporto. In questo studio viene valutata la presenza del DNA ed RNA di CP in tessuti cerebrali post-mortem per mezzo di 4 diverse tecniche.

Metodi. Sono stati esaminati campioni autoptici di corteccia cerebrale temporale in 19 pz (13M/6F, età media 61, tutti positivi per CP a livello vascolare); causa di morte embolia polmonare (4), malattie cardiovascolari (4), dissezione aortica (1), IMA (13) ed emorragia cerebrale e da 4 pazienti giovani deceduti per trauma (2M/2F, età media 19a). Sono state usate tecniche di PCR (gene ompA- nested), immunostochimica (IHC) (anticorpo RR402 vs proteina MOMP), PCR in situ ed RT-PCR in situ (gene e trascritto ompA - single step) e sequenza (ABI PRIMS 310 Genetic Analyzer, CA, USA). Come controllo sono state usate cellule HEP-2 infettate da CP in coltura.

Risultati. CP era presente in IHC e PCR in situ in 16 su 19 campioni, e in 14 su 19 mediante RT-PCR in situ e PCR; I controlli erano tutti negativi. L'analisi di sequenza ha confermato il gene ompA di CP (Bal-16 TWAR183).

Conclusioni. Nel nostro studio in 16 su 19 campioni cerebrali è riscontrabile il DNA di CP, in 14 su 19 l'RNA indice di espressione o di vitalità di CP. I nostri dati suggeriscono che il riscontro di CP potrebbe essere associato a una infezione cronica a cui potrebbero essere legate, a lungo termine, situazioni di neuroinfiammazione e sviluppo di patologie neurodegenerative. Ulteriori dati in vitro ed in vivo sono necessari per confermare questa ipotesi.

187

INTERAZIONE FRA DNA BATTERICO E MEMBRANE PER EMODIALISI: UN MODELLO "IN VITRO"

Cazzavillan S.¹, Ratanarat R.³, de Cal M.³, Zoppelletto M.², Grillone R.², Corradi V.³, d'Amore EGS.¹, Ronco C.³, Rattu M.²

¹U.O. Anatomia Patologica,

²U.O. Microbiologia e Virologia,

³U.O. Nefrologia, Ospedale San Bortolo, Via Rodolfi 36100 Vicenza, Italia.

Introduzione. I pazienti dializzati con patologia renale presentano una situazione infiammatoria cronica che contribui-

scie ad aumentare di circa 10 volte il rischio cardiovascolare rispetto alla popolazione normale. Studi recenti hanno dimostrato che piccoli frammenti di DNA batterico attraversano le membrane da emodialisi determinando infiammazione. Poiché i diversi biomateriali di cui sono composti i filtri da dialisi possono comportarsi in modo diverso nei confronti del DNA batterico (bdNA) abbiamo sviluppato un modello "in vitro" studiando il comportamento di 5 specifiche membrane biocompatibili da dialisi.

Metodi. In una apparecchiatura sperimentale per emodialisi, è stato fatto ricircolare sangue eparinato inoculato con *Paeruginosa* (150CFU/ml). Come controllo di infezione è stata effettuata una emocultura dopo 5 e 60 min dall'inoculo. Al termine dell'esperimento il filtro è stato lavato con 2 L di fisiologica e gli ultimi 100 ml sono stati coltivati. Dal compartimento del sangue (BL) e del dialisato (DIA) è stato estratto separatamente il DNA, ed è stato ricercato il DNA codificante per 16SrRNA (bdNA) mediante PCR. L'amplificato è stato sequenziato per conferma.

Risultati. I risultati sono riportati in tabella. La presenza di bdNA è stata evidenziata in tutti i filtri mediante metodo molecolare, nonostante l'emocultura degli ultimi 100 ml di fisiologica di lavaggio fosse negativa, e l'analisi di sequenza ha confermato i risultati. Nonostante l'inoculo nel sangue, il DNA di *Paeruginosa* è stato riscontrato anche nel DIA. I risultati sono paragonabili per tutti i filtri studiati.

Conclusioni. Dai dati ottenuti si può ipotizzare che i filtri agiscono da concentratori nei confronti del bdNA e che il bdNA può attraversare le membrane dei filtri. Dal momento che il bdNA è caratterizzato dalla presenza di strutture particolari che attivano il sistema immunitario umano con produzione di citochine proinfiammatorie, la sua presenza nel BL potrebbe spiegare l'infiammazione quando non attribuibile ad altre cause cliniche note.

Filtro da emodialisi	Emocultura			100 ml fisiologica finale	bdNA	
	Pre	5 min	60 min		Comp. sangue	Comp. dialisato
Fx100	Neg	+	+	Neg	+	+
Polyflux 210H	Neg	+	+	Neg	+	+
Nephral ST500	Neg	+	+	Neg	+	+
Filtrizer BK2.1F	Neg	+	+	Neg	+	+
Sureflux 190E	Neg	+	+	Neg	+	+

188

QUATTRO ANNI DI ATTIVITÀ PER L'ANTIBIOTICO-SENSIBILITÀ DI MTC

Santoro G., Falca M., Polidoro L. Russo F.

UOC Microbiologia e Virologia
Direttore Prof. Riccardo Smeraglia
A.O. Monaldi Via L.Bianchi Napoli

Introduzione. Nel 2002 abbiamo introdotto nel nostro laboratorio accanto al test di sensibilità in medium solido, Lowenstein-Jensen antibiotato, allestito secondo il metodo delle proporzioni (MOP), il test di antibiotico-sensibilità in medium liquido su ceppi del complesso *Mycobacterium tuberculosis*. Il nostro scopo è stato quello di ridurre i tempi di esecuzione dell'antibiogramma da 28 a 4-13 giorni. Inoltre, nel 2004, con l'introduzione del test Inno-LiPA

Rif.TB abbiamo rilevato, in tempi ancor più contenuti, la resistenza a RMP con l'analisi del genotipo.

Metodi. Kit BACTEC MGIT 960 SIRE della Becton Dickinson. Test di sensibilità (MOP) su Lowenstein-Jensen antibiotato della DASIT. Sistema INNO-LiPA Rif. TB della INNOGENETICS per la rilevazione della resistenza genotipica a RMP.

Risultati. Nel 2002 abbiamo affiancato SIRE e MOP su tutti i campioni; nel successivo anno tale protocollo è stato riservato solo ai pazienti di primo accesso mentre il monitoraggio dei pazienti a controllo veniva effettuato solo con SIRE e, all'insorgenza, le nuove resistenze confermate anche con il MOP. Successivamente abbiamo introdotto il test di genotipizzazione sui ceppi fenotipicamente resistenti a RMN. In media, per ogni anno, abbiamo allestito circa 90 tests di antibiotico-sensibilità, relativi ad altrettanti pazienti. I risultati di tali tests ci hanno portato alle seguenti percentuali di resistenza, dedotte dai tests in medium liquido, per gli antibiotici in tabella:

	SM	INH	RMP	EMB	PZA
2002	17.7%	25.3 %	8.9 %	3.8 %	NT
2003	11.4 %	24.7 %	9.0 %	3.5 %	4.8 %
2004	31.2 %	26.3 %	17.2 %	6.5 %	9.0 %
2005	17.7 %	22.7 %	11.5 %	6.3%	9.5 %

Tali percentuali risultano sovrapponibili a quelle osservate con i tests in medium solido ad eccezione dell'EMB che esprime percentuali più basse mediamente di 2 punti.

Discussione. L'esperienza acquisita in questi anni nella diagnostica dell'antibiotico-sensibilità, ci consente di abbandonare definitivamente l'uso MOP e di introdurre il test di genotipizzazione direttamente su campioni positivi all'esame microscopico ed all'amplificazione genica per MTC. Ciò consentirà di rilevare la resistenza alla rifampicina e quindi, per la nota associazione con INH, di eventuale ceppo MDR con un anticipo valutabile in circa 4 settimane. Questa informazione per il clinico risulterà di enorme utilità ed a vantaggio del paziente che eviterà l'assunzione di farmaci inadeguati ed il prolungamento del tempo di degenza. Inoltre, in tal modo, è possibile attuare un più stretto controllo sulla diffusione di ceppi MDR ed un contenimento della spesa sanitaria relativa ai costi di una terapia inappropriata ed al prolungamento dei tempi di degenza.

189

UN CASO DI TUBERCOLOSI INTESTINALE SOSTENUTO DA MYCOBACTERIUM GORDONAE DIMOSTRATO MEDIANTE POLYMERASE CHAIN REACTION ED IBRIDAZIONE IN SITU INVERSA

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

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

Caso Clinico. In una paziente di 46 anni, venuta alla nostra osservazione nel Marzo 2006, l'endoscopia diagnostica evidenziava la presenza di lesioni suggestive di IBD. Durante la colonscopia venivano eseguite biopsie multiple, sia per esame istologico, sia per la ricerca di Micobatteri.

Materiali e Metodi. I campioni biotici sono stati ridotti in aliquote da 25 mg circa. Una parte di queste è stata omogeneizzata in 2 ml di soluzione salina sterile 0.85% ed avviata all'esame culturale; almeno tre aliquote sono state conservate a

-25°C e processate entro 24h per l'estrazione del DNA con il metodo di estrazione di DNA da tessuti *High pure PCR Template Preparation Kit*® dalla Ditta ROCHE, che prevede digestione con *Proteinasi K*®, seguita da eluizione su colonne *High Pure Filter Tube*®. La PCR sugli eluati è stata eseguita utilizzando la DNA Polimerasi *AmpliTaq Gold*® della Ditta Applied Biosystem secondo il protocollo di amplificazione della regione spaziatrice 16S-23S del genere *Mycobacterium* indicato dal kit *INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 Amp*® della Ditta INNOGENETICS. I seguenti cicli termici sono stati eseguiti su termociclatore P.E. Cetus PE2400:

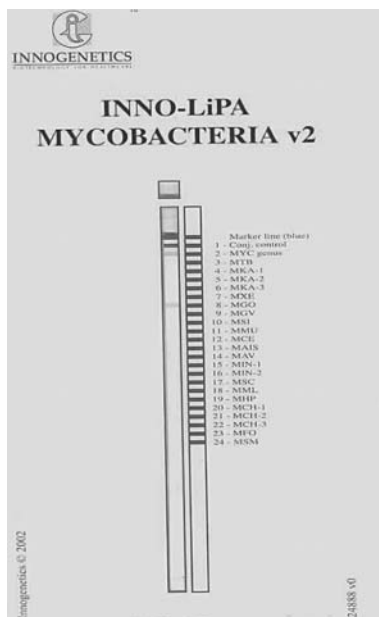
1. Denaturazione	95°C	1 min	} <u>40 volte</u>
2. Denaturazione	95°C	30 sec	
3. Appaiamento	62°C	30 sec	
4. Appaiamento	72°C	30 sec	
5. Hold	4°C	∞	

L'identificazione degli amplificati è stata effettuata con il metodo *INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2*® della Ditta INNOGENETICS, basato sul principio della ibridazione inversa: i prodotti dell'amplificazione sono stati biotinilati ed ibridati con sonde oligonucleotidiche immobilizzate su strisce di reazione, corrispondenti a 22 specie di *Mycobacterium*; altre 2 linee di controllo corrispondono rispettivamente al controllo di reazione del coniugato ed alla presenza del gene comune al genere *Mycobacterium*. L'ibridazione viene svelata dall'incubazione della striscia in presenza di streptavidina legata a fosfatasi alcalina e successivamente dall'aggiunta del cromogeno.

Risultati. La presenza di DNA di *M. gordonae* nel campione è evidenziata dalla corrispondente linea di ibridazione inversa sulla striscia di reazione. (Fig.1)

Discussione. La ricerca tramite PCR di bacilli appartenenti al Genere *Mycobacterium* in campioni biotici intestinali, può contribuire a porre la diagnosi differenziale tra *M. di Crohn* e *Tubercolosi intestinale*. Nel caso in esame la coltura confermava dopo 21 giorni la presenza di *M. gordonae*. L'esperienza descritta suggerisce l'utilità di estendere la ricerca di Micobatteri anche a specie non comunemente coinvolte in processi intestinali, ricorrendo a metodi molecolari, altamente specifici e più sensibili rispetto ai metodi tradizionali.

Figura 1



190

GENOTIPI DI VIRUS C IN UN CAMPIONE DI PAZIENTI AFFERENTI ALLA U.O. SEMPLICE DI MICROBIOLOGIA, P.O. CASTROVILLARI

Venditti W., Bonifati A., Capano A., Di Vasto M., Maltese R., Vicchio T.

Unità Operativa di Microbiologia, P.O. Castrovillari (CS), Azienda Sanitaria N. 2

Introduzione. L'infezione da virus dell'epatite C rappresenta attualmente uno dei più importanti problemi di sanità pubblica a livello mondiale.

I virus che causano l'epatite C costituiscono un gruppo che presenta sottotipi estremamente variabili. Lo studio del genotipo del virus HCV rappresenta un momento importante nella definizione epidemiologica e clinica dell'infezione. Il genotipo identifica la virulenza del ceppo infettante e consente di individuare categorie differenti di pazienti a cui applicare protocolli di trattamento antivirale differenziati. In Italia ed in Europa vi è una netta prevalenza del genotipo 1, ed in particolare del genotipo 1b.

Materiali e metodi. Nell'arco temporale 2003-2005 sono stati tipizzati i genotipi HCV di 211 pazienti, di cui 71 provenienti dal SERT e 140 ambulatoriali. L'RNA virale veniva estratto da campioni di siero la cui positività è stata rivelata mediante RT-PCR (Cobas Amplicor HCV, Roche) e genotipizzato mediante tecnica di ibridazione inversa su supporto solido (Versant HCV genotipo LiPA, Bayer).

Risultati. Il genotipo 1b è stato riscontrato nel 41% dei pazienti ambulatoriali e nel 6% dei pazienti provenienti dal SERT; il genotipo 1a rispettivamente nel 16 e 19% ; il 2a / 2c è stato riscontrato nel 5 e 43%; il 2a nel 10 e 1%; il 3a nel 26 e 25%; il 4 nel 2 e 7% .

Conclusioni. Il genotipo 1b è risultato essere, come ci si attendeva, il più frequente tra i pazienti ambulatoriali, i genotipi 2a e 4 i meno frequenti; nei pazienti afferenti al SERT è risultato essere più frequente il genotipo 2a/2c. In particolare lo studio del genotipo di HCV in questa ultima popolazione di pazienti, ad alto rischio di trasmissione del virus, rappresenta un utile marcatore di diffusione del virus, offrendo utili informazioni sulla modalità di selezione e circolazione dei genotipi virali.

191

HPV: CONDIZIONE NECESSARIA MA NON SUFFICIENTE NELL'EZIOLOGIA DEL CANCRO DELLA CERVICE

Venditti W.¹, Bonifati A.¹, Di Vasto M.¹, Stigliano C.M.³, Caruso W.², Fabrizio A.³, Schifino F.³

¹U.O. semplice Microbiologia

²U.O. Anatomia Patologica

³U.O. Ginecologia Preventiva, P.O. Castrovillari (CS), Azienda Sanitaria N. 2

Introduzione. I papillomavirus sono virus a DNA a simmetria icosaedrica, mancanti di rivestimento pericapsidico. Dati biologici ed epidemiologici hanno portato a suddividere gli

HPV in alto, medio e basso rischio oncogenico in base al rischio più o meno significativo nell'indurre la trasformazione neoplastica. Gli HPV ad alto rischio rappresentano la principale causa dell'insorgenza di tumori della cervice uterina. L'infezione da HPV ad alto rischio non conduce all'immediato sviluppo di neoplasie invasive in quanto nella maggior parte dei casi l'infezione si risolve da sola, in altri il virus rimane latente per lunghi periodi di tempo, fino anche 20-50 anni. Il picco di incidenza dell'infezione genitale nelle donne si evidenzia nelle fasce di età intorno ai 20 anni, invece la malattia neoplastica necessita di una fase di latenza e raggiunge la sua massima incidenza nelle donne con oltre i 40 anni di età. È evidente che nella eziopatogenesi tumorale sia necessaria la persistenza dell'infezione virale. Tuttavia come un'infezione produttiva sia in grado di diventare a lunga permanenza e/o quali fattori possano dare luogo a lesioni cervicali reversibili dipende verosimilmente dalle situazioni fisiologiche ed immunologiche di ciascuna donna.

Metodi. Il nostro studio effettuato in circa sei mesi di lavoro su pazienti afferenti al centro di Ginecologia Preventiva² età compresa tra i 16 -75 anni sottoposte a pap-test e a ricerca dell'HPV-DNA.

Il test utilizzato per il riconoscimento dell'infezione da HPV si basa sulla tecnica del branched-DNA con una amplificazione finale del segnale, il test non distingue i sottotipi di papillomi implicati, ma stratifica il rischio di sviluppo di cancro della cervice distinguendo gli HPV in alto e basso rischio oncogeno, fornisce inoltre informazioni circa la carica virale infettante.

Risultati. Su un totale di 305 pazienti il riscontro dell'infezione da HPV è stato di 76 positivi pari al 25% ed era correlato alle seguenti alterazioni citologiche:

PAP-NEGATIVO	40 pari al	52,5%
ASCUS	8 pari al	10,5%
L -SIL	13 pari al	17,1%
H -SIL	12 pari al	15,7% di cui 5 CIS

Conclusioni. La presenza di HPV alto rischio con pap-test negativo si è riscontrato in pazienti di età compresa tra 18 e 35 anni. HPV alto rischi con ascus ed l-sil, in pazienti di età compresa tra 35 e 42 anni.

HPV alto rischio con h-sil e ca microinvasivo in pazienti con età superiore ai 43 anni.

²Trattasi di centro di riferimento regionale di secondo livello

192

VALUTAZIONE DELLA PERSISTENZA DI DIVERSI GENOTIPI DI HPV NEL FOLLOW-UP DI PAZIENTI TRATTATE PER LESIONI CERVICALI DI ALTO GRADO

Venturoli S.¹, Ambretti S.¹, Cricca M.^{1,2}, Gallinella G.¹, Manaresi E.¹, Bonvicini F.¹, Filippone C.¹, Musiani M.¹, Zerbini M.¹

¹D.M.C.S.S - Divisione di Microbiologia, Università di Bologna,
²C.R.R.E.M. - Azienda Ospedaliera S.Orsola Malpighi;
 Via Massarenti 9, 40138 Bologna

Introduzione. Molti studi di follow up su pazienti sottoposte a trattamento di conizzazione per lesioni cervicali di alto grado (CIN2/3, carcinoma invasivo) hanno dimostrato una elevata persistenza degli HPV ad alto rischio oncogeno (HR-

HPV) anche nei casi in cui la lesione è stata completamente rimossa. La persistenza del virus aumenta il rischio di recidiva della lesione.

Scopo del nostro studio è stato valutare la persistenza di HPV dopo conizzazione e la percentuale di clearance dei diversi genotipi. A tale scopo abbiamo impiegato il metodo di PCR combinato a genotipizzazione [Line Blot Assay-Roche (LBA)] nell'analisi di 35 pazienti con lesioni di alto grado.

Metodi. Trentacinque donne sottoposte a conizzazione per lesioni di alto grado e risultate positive per HR-HPV in Hybrid Capture II sono state selezionate per il nostro studio. Di tutte le pazienti è stato analizzato, impiegando il saggio di amplificazione e genotipizzazione PCR-LBA, il prelievo al momento del trattamento e un prelievo a 3-6 mesi. I risultati ottenuti con il metodo di tipizzazione LBA sono stati confrontati con quelli ottenuti con un metodo di tipizzazione ELISA home-made.

Di tutte le pazienti è stato osservato l'istologico su cono e lo stato dei margini al fine di valutare la corretta rimozione della lesione. Inoltre tali pazienti hanno mostrato un Pap test normale nel controllo a 3-6 mesi.

Risultati. Al momento del trattamento, i genotipi identificati con maggiore frequenza sono stati HPV16 (47%), HPV31 (12%) e HPV33 (12%), mentre il 25% delle pazienti analizzate ha mostrato un'infezione mista. Nel 44 % dei prelievi eseguiti a 3-6 mesi dal trattamento si è evidenziata una persistenza dell'infezione da HR HPV. La persistenza virale è risultata differente a seconda del genotipo, infatti le pazienti con infezione da HPV16 hanno evidenziato una clearance del 67%, contro il 47% di quelle interessate da altri genotipi ad alto rischio oncogeno (31-33-52-58).

Conclusioni. L'impiego di tecniche per la genotipizzazione di un ampio spettro di HPV, quali il metodo Line Blot Assay (Roche), permette di valutare la persistenza virale dopo trattamento chirurgico per lesioni di alto grado e di correlare la clearance virale ai diversi genotipi di HPV. La persistenza dell'infezione da HR-HPV in pazienti trattate per lesioni cervicali di alto grado e con citologia negativa rappresenta un importante fattore predittivo del rischio di recidiva.

193

VALUTAZIONE DI UN SISTEMA DIAGNOSTICO AUTOMATIZZATO PER LO STUDIO MOLECOLARE DI INFEZIONI ERPETICHE DEL SISTEMA NERVOSO

Verzaro, S., Mancini, C., Nazzari, C., Latte, M. C., Fabri, G., Gaeta, A.

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica,
 Università degli Studi "La Sapienza", P.le A. Moro 5, 00185 Roma

Introduzione. I virus erpetici svolgono un ruolo importante nella eziopatogenesi di varie sindromi infettive a carico del sistema nervoso. Essi sono ritenuti responsabili sia di patologie acute del sistema nervoso centrale con liquor limpido, o meningoencefaliti, sia di sindromi post-infettive; inoltre il Cytomegalovirus e l'Herpes virus 6 sono stati correlati a patologie del sistema nervoso periferico quali la Sindrome di Guillain - Barré.

Negli ultimi anni i notevoli progressi ottenuti nella diagnosi virologica hanno rivoluzionato l'approccio clinico verso il paziente neurologico grazie all'impiego di protocolli diagno-

stici rivolti all'analisi genomica qualitativa e quantitativa. Scopo del nostro studio è stata la messa a punto di un sistema diagnostico che associa una tecnica di estrazione automatica di DNA ad un'amplificazione genica di tipo Real Time per l'analisi di campioni di liquido cerebrospinale.

Metodi. Sono stati analizzati 154 campioni di liquor prelevati da Febbraio 2005 a Febbraio 2006 da pazienti affetti da patologie acute e croniche del sistema nervoso afferenti al Policlinico "Umberto I" di Roma.

I campioni sono stati processati per l'estrazione degli acidi nucleici mediante un sistema automatico e il DNA ottenuto è stato sottoposto ad analisi mediante Real Time PCR di tipo Taq – Man per l'identificazione di HSV-1, HSV-2, EBV, HCMV, HHV6. Un sistema di PCR Nested è stato impiegato per l'identificazione di VZV.

Risultati. Dei campioni analizzati 118 (76.6%) sono risultati negativi ai virus erpetici testati e 36 (23.4%) positivi rispettivamente a: 11 VZV, 7 HSV-1, 4 HSV-2, 7 HHV6, 4 EBV, 1 EBV ed HSV-2, 1 VZV ed HHV6 e 1 HCMV ed EBV. Tempo di refertazione 3 ore dall'arrivo del campione clinico.

Conclusioni. Nel sistema da noi studiato l'automazione della fase di estrazione associata all'amplificazione di tipo Real Time ha permesso di ottenere risultati accurati con elevata rapidità di esecuzione ed aumento dell'efficienza diagnostica.

194

RILEVAZIONE MOLECOLARE DELLE RESISTENZE DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN CAMPIONI CLINICI

Zara F.¹, Meacci F.², D'Amato V.², Troupioti P.³, Sarassi A.³, Brerra R.¹, Pardini M.⁴, Orrù G.⁵, Ciusa M.L.⁵, Pagani L.¹, Orefici G.⁴, Fattorini L.⁴, Oggioni M.R.²

¹Sez. Microbiologia, Dip. SMEC, Università di Pavia, Via Brambilla 74, 27100 Pavia

²La.M.M.B., Dip. Biologia Molecolare, Università di Siena, Policlinico Le Scotte, Via Bracci, 53100 Siena

³AOV Azienda Ospedaliera Valtellina e Valchiavenna Presidio di Sondalo, Via Zubiani 33, 23039 Sondalo,

⁴Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma,

⁵O.B.L., Università di Cagliari, Via Binaghi 4, 09121 Cagliari.

Introduzione. La selezione di mutanti di resistenza ad isoniazide e rifampicina è generalmente la causa di fallimenti terapeutici e del prolungato decorso clinico delle infezioni da *Mycobacterium tuberculosis*.

Pertanto sono necessari metodi molecolari utili ad una rapida rilevazione di tali mutazioni.

Metodi. 103 escreti, raccolti da 103 pazienti ospedalizzati ed ambulatoriali presso l'Azienda Ospedaliera di Sondalo nel periodo gennaio 2005 - gennaio 2006, sono stati decontaminati con NALC-NaOH e valutati mediante esame batterioscopico, coltura in Lowenstein-Jensen e MGIT 960. L'analisi molecolare è stata effettuata, dopo valutazione dell'idoneità del campione, con PCR qualitativa con target IS6110, real time PCR con sonde lineari FRET e tipizzazione con MIRU. L'antibiogramma per farmaci di seconda scelta è stata eseguito secondo protocolli standard.

Risultati. Con i metodi molecolari, la mutazione *katG315*

associata alla resistenza ad isoniazide è stata rilevata nel 15,4% dei campioni analizzati e nel 22,3% dei casi è stata evidenziata la mutazione *rpoB531* responsabile della rifampicina-resistenza. In 4 campioni la PCR real time sul gene *rpoB* ha evidenziato una popolazione mista (allele wild type e allele mutato).

I metodi molecolari e fenotipici hanno dato risultati sovrapponibili nel 97,4% dei casi per la resistenza ad isoniazide e nel 96% dei casi per la resistenza a rifampicina.

Conclusioni. L'analisi dei risultati ottenuti evidenzia una ottima concordanza tra i dati clinici, microbiologici e le caratterizzazioni molecolari, mostrando che l'approccio integrato colturale e molecolare può essere un utile strumento per la valutazione clinica e la gestione del paziente con tubercolosi.

195

INFEZIONE DA H. PYLORI: RUOLO DELLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE ED ESPERIENZA SULLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI

Basaglia G.¹, Cannizzaro R.², Sperandio P.¹, Stocco Calzavara S.¹, Pancino A.¹, Fornasari M.², Lacchin T.², De Paoli P.¹

¹UO di Microbiologia, Immunologia e Virologia

²UO di Gastroenterologia Oncologica

Centro di Riferimento Oncologico, Istituto Nazionale Tumori, IRCCS, Via Pedemontana Occ., 12, 33081 Aviano (Pordenone).

Introduzione. L'infezione da *Helicobacter pylori* è stata negli anni studiata sotto vari aspetti. E' ben nota la sua associazione con gastrite cronica, ulcera duodenale e gastrica, adenocarcinoma e MALT linfoma gastrici. Le indagini microbiologiche svolgono per questa infezione un ruolo importante sia dal punto di vista diagnostico che di ricerca (ruolo e indicazioni sono stati ripresi anche dal recente *Maastricht 3 Consensus Report*, 2005). Molti di questi aspetti sono stati da noi studiati e pubblicati. Nel controllo delle patologie associate riveste grande importanza la sensibilità di *H. pylori* agli antibiotici. Scopo del presente studio è di raccogliere tutti i dati sugli antibiogrammi eseguiti nel nostro Laboratorio per offrire un quadro epidemiologico in riferimento ai pazienti seguiti nel nostro Istituto.

Metodi. Sono stati studiati i ceppi isolati, nell'arco di 8 anni (1998-2006), da 123 pazienti afferenti all'UO di Gastroenterologia Oncologica del nostro Istituto sintomatici per patologia *H. pylori* associata o soggetti a rischio per lesioni neoplastiche. L'antibiogramma è stato eseguito con E-test per metronidazolo, claritromicina e amoxicillina e, negli ultimi 2 anni, per tetraciclina e levofloxacina.

Risultati. La percentuale delle resistenze per paziente è risultata: metronidazolo 59.8% (73/122), claritromicina 52.8% (65/123), amoxicillina 0% (0/122), tetraciclina 0% (0/51) e levofloxacina 24% (12/50).

Conclusioni. La nostra casistica rileva per metronidazolo e claritromicina percentuali elevate di resistenza, per levofloxacina tali percentuali sono più contenute e non sono rilevate invece per amoxicillina e tetraciclina. I dati trovano riscontro con quanto riportato in Letteratura. Per quanto riguarda in particolare le elevate percentuali relative a metronidazolo e claritromicina queste sono giustificabili tenendo

presente che molti dei pazienti studiati sono stati sottoposti a più linee di antibiotico-terapia capaci di selezionare i ceppi di *H. pylori* più resistenti. La disponibilità dell'antibiogramma per *H. pylori* è risultata utile per l'eradicazione di *H. pylori* resistenti al trattamento antibiotico di prima e seconda linea in pazienti sintomatici e in soggetti a rischio per lesioni neoplastiche. Inoltre il quadro epidemiologico riportato può essere utile a livello locale (ma arricchisce le nostre conoscenze anche per confronti più ampi) per una terapia empirica sempre più appropriata dell'infezione da *H. pylori*.

196

VALUTAZIONE DI UN TEST ELISA PER IL MONITORAGGIO TERAPEUTICO DI NELFINAVIR IN PAZIENTI HIV POSITIVI

Genco F., Meroni V., Uglietti A., Montagna M.¹, Regazzi Bonora M.¹, Maserati R.

Dipartimento di Clinica di Malattie Infettive, Università degli Studi Pavia.

¹ Dipartimento di Farmacologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Introduzione. Il monitoraggio terapeutico dei farmaci (TDM- Therapeutic Drug Monitoring) è diventato recentemente un importante strumento per ottimizzare la terapia antiretrovirale. La misurazione del TDM viene solitamente condotta con l'HPLC (High-Performance Liquid Chromatographic Assay) ormai ritenuta il golden standard.

Ma poiché la difficile esecuzione di questo test lo rende appannaggio di pochi centri specializzati negli ultimi due anni sono state introdotte nuove tecniche di misurazione della concentrazione plasmatica di farmaci (Nelfinavir, Lopinavir, Amprenavir etc.) come i test immunoenzimatici competitivi. Scopo dello studio è stato mettere a punto e valutare un test immunoenzimatici per il dosaggio di Nelfinavir prodotto dalla ditta BioStrands in comparazione con i dati ottenuti in HPLC.

Metodi. Campioni di plasma di pazienti HIV positivi in terapia con Nelfinavir sono stati prelevati allo stesso tempo a pazienti diversi e a tempi diversi allo stesso paziente per valutare le variazioni intra-paziente e inter-paziente del TDM. Sono stati analizzati 100 campioni e di questi la metà è stata esaminata anche con HPLC.

Risultati. L'andamento del TDM nel tempo risulta sovrapponibile a quello ottenuto con l'HPLC anche se diverso in valore assoluto.

Conclusioni. I nuovi tests immunoenzimatici non necessitano di una particolare strumentazione, risultano più semplici e rapidi da eseguire una volta acquisita la tecnica e danno risultati sovrapponibili alla curva delle concentrazioni plasmatiche dei farmaci misurate con l'HPLC.

197

ATTIVITÀ IN VITRO DI PRULIFLOXACINA VS. P.AERUGINOSA: CONFRONTO CON CIPROFLOXACINA E LEVOFLOXACINA

Lanzafame P., Sartor A., Baron MT.

S.O.C. Microbiologia Azienda Ospedaliera S.Maria della Misericordia, Ple S.Maria della Misericordia 15, 33100 Udine

Introduzione. Prulifloxacin è una nuova molecola antibiotica della classe dei fluorochinoloni e rappresenta il profarmaco di Ulifloxacin, in cui è trasformata immediatamente dopo l'assorbimento ad opera di una esterasi: la paraossinasi. Il meccanismo di azione è dovuto alla inibizione delle topoisomerasi II e IV e proprio all'azione sulla topoisomerasi II sembra sia dovuta la marcata attività battericida riscontrata in vitro nei confronti di *P.aeruginosa*.

Metodi. Nel nostro studio abbiamo valutato l'attività in vitro di Prulifloxacin versus *P.aeruginosa* e confrontato i risultati con quelli ottenuti con Ciprofloxacina e Levofloxacina.

150 isolati clinici di *P.aeruginosa*, di cui 75 risultati resistenti alla Ciprofloxacina (MIC ≥ 4), sono stati sottoposti a test di sensibilità a Prulifloxacin, Ciprofloxacina e Levofloxacina con metodica di diffusione in agar (Kirby-Bauer) su terreno Mueller Hinton agar, utilizzando dischetti con concentrazioni di 5µg. L'interpretazione ed i controlli di qualità (*P.aeruginosa* ATCC 27853) sono stati effettuati secondo le indicazioni NCCLS (M100-S16).

Risultati. I 75 ceppi di *P.aeruginosa* risultati resistenti a Ciprofloxacina sono stati confermati tutti con la tecnica di diffusione in agar; 5 di questi isolati hanno presentato sensibilità intermedia a Prulifloxacin e tutti sono risultati resistenti a Levofloxacina. Dei 75 ceppi risultati sensibili a Ciprofloxacina 13 sono risultati resistenti e 4 con sensibilità intermedia a levofloxacina, mentre tutti si sono dimostrati sensibili alla Prulifloxacin. I diametri degli aloni di sensibilità hanno presentato distribuzioni modali differenti per le tre molecole: Ciprofloxacina ha presentato un unico picco corrispondente a 33 c-m, Levofloxacina una distribuzione trimodale con picchi a 20,26 e 28 cm, Prulifloxacin una distribuzione bimodale a 30 e 35 cm.

Conclusioni. Prulifloxacin conferma una migliore attività in vitro rispetto a Levofloxacina e sostanzialmente equivalente alla attività di Ciprofloxacina nei confronti della quale ha il vantaggio della monosomministrazione giornaliera e quindi una migliore compliance del paziente a parità di costi per ddd.

197A

EVOLUZIONE DI STREPTOCOCCUS AGALACTIAE VERSO LA RESISTENZA ALLA PENICILLINA

Piatti G., Bandettini R., Mentasti M., Dono M., Battolla E., Santoriello L., Lemmi-Casini M., Ronca A., Serra D., Intra E., Cavallini F., Debbia E.A., Marchese A.

Sez. di Microbiologia DISCAT Università di Genova

Introduzione. Lo streptococco di gruppo B (GBS) è causa frequente di sepsi e infezioni gravi nel neonato e nella donna gravida. La penicillina rimane il farmaco di scelta per il trattamento e la profilassi delle infezioni da *S. agalactiae*. La totale sensibilità di GBS ai β -lattamici, non modificatasi nel tempo, potrebbe evolvere negativamente. Fallimenti terapeutici attribuiti al fenomeno della tolleranza e la considerazione di quanto avviene nelle specie batteriche correlate allarmano la comunità scientifica che, come per *Streptococcus pyogenes*, invita alla continua sorveglianza della sensibilità reale alla penicillina e altri β -lattamici nello streptococco di gruppo B.

In questo studio è stata valutata la sensibilità alla penicillina di 754 ceppi di streptococco di gruppo B isolati in Liguria nel 2005 da campioni clinici.

Materiali e metodi. Ceppi analizzati: sono stati valutati 699 ceppi di GBS provenienti da laboratori liguri, isolati da tamponi vaginali, tamponi rettali, urine. L'identificazione è stata eseguita con metodi routinari e confermata con agglutinazione al lattice. La sensibilità a penicillina, eritromicina e clindamicina è stata determinata come suggerito da CLSI mediante metodo della diluizione in agar.

Risultati: nella Tabella sono riportati i valori della sensibilità agli antibiotici valutati durante lo studio. Sul totale degli isolati sono stati individuati ceppi con sensibilità al limite e 1 ceppo totalmente resistente alla penicillina

Antibiotico	N	Range	ceppi resistenti (n%)
Penicillina	754	<0.015-2	1 / 0,13
Eritromicina	754	0.015-8	192 / 25.5
Clindamicina	754	0.03-8	143 / 19,0

Conclusioni: le presenti osservazioni indicano per la prima volta nel nostro paese un'evoluzione verso la resistenza alla penicillina di *S. agalactiae* suggerendo la necessità di una periodica osservazione di questa tendenza negativa.

197B

SCOMPOSIZIONE DI UN CAMPO ELETTROMAGNETICO IN CAMPO MAGNETICO E RADIOFREQUENZA: CONFRONTO DEL POTERE BATTERICIDA

Cassanelli C., Ferri G., Roveta S., Marchese A., Debbia E.A.

Università di Genova, Sezione di Microbiologia-DISCAT

Obiettivo: Valutare la batterioidia che si riscontra sottoponendo una sospensione batterica ad un campo elettromagnetico, ad un campo magnetico, e alla radiofrequenza, generati con gli stessi valori di potenza, frequenza e tempo di scarica in modo da separare l'effetto prodotto dall'innalzamento della temperatura dall'azione del campo generato durante la scarica.

Materiali e metodi: Da una sospensione di *Enterococcus faecalis* sono stati prelevati 0,1ml con un puntale e sottoposti al campo all'interno del puntale stesso.

Per ogni tipologia di campo generato il campione è stato trattato con un numero di scariche crescenti fino ad arrivare a tre.

La morte batterica è stata confrontata con un campione non trattato.

Risultati: In tutte le condizioni sperimentali è stata dimostrata una diminuzione della carica batterica con un massimo di caduta del 90% delle CFU/ml nel caso del campo magnetico.

CAMPI APPLICATI	Concentrazione batterica iniziale	Concentrazione batterica finale
Elettromagnetico 1 scarica	$1,47 \pm 1,27 \times 10^8$	$1,02 \pm 1 \times 10^8$
Elettromagnetico 2 scariche	$1,47 \pm 1,27 \times 10^8$	$9,48 \pm 1,03 \times 10^7$
Elettromagnetico 3 scariche	$1,47 \pm 1,27 \times 10^8$	$4,5 \pm 5 \times 10^7$
Radiofrequenza 1 scarica	$1,47 \pm 1,27 \times 10^8$	$1,08 \pm 1 \times 10^8$
Radiofrequenza 2 scariche	$1,47 \pm 1,27 \times 10^8$	$6,1 \pm 6 \times 10^7$
Radiofrequenza 3 scariche	$1,47 \pm 1,27 \times 10^8$	$5,2 \pm 4,4 \times 10^7$
Campo magnetico 1 scarica	$1,47 \pm 1,27 \times 10^8$	$1,29 \pm 0,8 \times 10^7$
Campo magnetico 2 scariche	$1,47 \pm 1,27 \times 10^8$	$7,57 \pm 3,1 \times 10^6$
Campo magnetico 3 scariche	$1,47 \pm 1,27 \times 10^8$	$1,9 \pm 1,5 \times 10^7$

Conclusioni: Si può affermare che l'applicazione di un campo elettromagnetico ad una sospensione batterica produce un effetto battericida dovuto all'insieme delle componenti del campo, dove l'innalzamento della temperatura gioca un ruolo marginale rispetto al campo vero e proprio; ciò è dimostrato dalla mancanza di una sostanziale differenza tra la batterioidia che si riscontra con il solo campo magnetico, dove l'innalzamento della temperatura è minimo e l'effetto che si ottiene con l'applicazione di un circuito è chiuso, dove l'innalzamento della temperatura è massimo. L'apparecchio con cui sono stati generati i campi (Endox Endodontic System) è utilizzato in terapia per il trattamento delle infezioni non sistemiche.

197C

PROFILO MICROBIOLOGICO DI RIFAXIMINA

Maioli E, Marchese A., Debbia E.A.

Sezione di Microbiologia - DISCAT, Università di Genova

Introduzione. Rifaximina è un derivato della rifampicina ad uso orale per il trattamento delle infezioni gastrointestinali. In questo studio è stato tracciato un profilo microbiologico della rifaximina.

Metodi. Saggi di sensibilità e curve di batteriocidia sono stati eseguiti come suggerito da CLSI (2005). L'eliminazione plasmidi è stata studiata coltivando i ceppi in presenza di rifaximina o ciprofloxacina ($0,5 \times \text{MIC}$) per 20 generazioni con una carica iniziale $<1000 \text{ CFU/ml}$. Coniugazione e le altre tecniche sono quelle standard.

Risultati. Rifaximina ha dimostrato un'attività battericida dipendente dal tempo di contatto tra germe e antibiotico, ma non dalla concentrazione usata. La frequenza con cui sono stati trovati i ceppi resistenti è stata $2,6 \times 10^{-7}$. Il farmaco ha causato alterazioni morfologiche, in ceppi sensibili e resistenti a concentrazioni sino a $1/32$ la MIC. La determinazione della concentrazione che previene l'insorgenza spontanea di ceppi resistenti (MPC) è stata $>1024 \text{ mg/L}$. La rifaximina ha causato l'eliminazione di plasmidi ad alto PM in *Escherichia coli* (37,2%) e basso PM (9.0%), produttore di ESB (25,7%) e di tossine ETEC (41,6%); penicillinasi in *Staphylococcus aureus* (10,5%), ESB produttori in *Morganella morganii* (34,0%), *Citrobacter freundii* (28,8%), *Proteus mirabilis* (20,5%) e *Klebsiella pneumoniae* (40,5%) anche durante la selezione di ceppi resistenti, ma con incidenza variabile. Il trasferimento di materiale genetico è stato inoltre inibito di oltre 100 volte rispetto ai ceppi di controllo. La MIC del ceftazidime su ceppi ESB è stata ridotta di 2-4 diluizioni in presenza di rifaximina ($0,5 \times \text{MIC}$). La ciprofloxacina usata come riferimento in tutti i saggi ha avuto un comportamento simile.

Conclusioni. La rifaximina ha dimostrato di influire globalmente sul fitness della cellula riducendone la patogenicità e virulenza anche se il ceppo evolve verso la resistenza al farmaco.

197D

ATTIVITÀ IN VITRO DI TIGECICLINA SU 200 CEPPI (TIGECYCLINE EVALUATION AND SURVEILLANCE TRIAL -T.E.S.T.- PROGRAM)

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

Sezione di Microbiologia - DISCAT, Università di Genova

Introduzione. In questo studio è stata valutata (nell'ambito del progetto globale T.E.S.T. program) l'attività in vitro di tigeciclina (TIG), un antibiotico appartenente alla nuova classe delle glicilciline, su isolati clinici nosocomiali e comunitari.

Metodi. Un totale di 200 isolati, 135 Gram-negativi (25 *Escherichia coli*, 25 *Enterobacter* spp., 25 *Klebsiella* spp., 20 *Pseudomonas aeruginosa*, 15 *Haemophilus influenzae*, 15 *Acinetobacter* spp., 10 *Serratia marcescens*) e 65 Gram-positivi (25 *Staphylococcus aureus*, 15 *Enterococcus* spp., 15 *Streptococcus pneumoniae*, 10 *Streptococcus agalactiae*), sono stati raccolti nel periodo 2004-2005 presso la Sezione di Microbiologia dell'Università di Genova e identificati a livello di specie. Le minime concentrazioni inibenti (MIC) sono state determinate tramite il metodo della microdiluzione in brodo secondo le indicazioni del CLSI (2005). *E. coli* ATCC25922 e *S. aureus* ATCC 29213 sono stati utilizzati come controlli di qualità. TIG è stata fornita dalla Wyeth Pharmaceuticals.

Risultati. nella Tabella sono riportati i microrganismi saggiati con i rispettivi valori di MIC-range, MIC₅₀ e MIC₉₀ relativi a TIG.

Microrganismo (n. ceppi saggiati)	MICrange (mg/l)	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)
<i>E. coli</i> (25)	0,12-8	0,25	1
<i>Enterobacter</i> spp.(25)	0,25-16	1	2
<i>Klebsiella</i> spp. (25)	0,25-8	1	4
<i>P. aeruginosa</i> (20)	2->16	16	>16
<i>H. influenzae</i> (15)	0,12-0,5	0,25	0,5
<i>Acinetobacter</i> spp. (15)	0,03-1	0,12	1
<i>S. marcescens</i> (10)	1-4	2	4
<i>S. aureus</i> (25)	0,06-0,5	0,25	0,5
<i>Enterococcus</i> spp.(15)	0,06-0,5	0,25	0,5
<i>S. pneumoniae</i> (15)	0,03-1	0,06	1
<i>S. agalactiae</i> (10)	0,12-4	2	4

Conclusioni. TIG ha mostrato una significativa attività antibatterica sia nei confronti dei Gram-negativi che dei Gram-positivi, con valori di MIC₅₀ $\leq 2 \text{ mg/l}$ e MIC₉₀ $\leq 4 \text{ mg/l}$ su tutte le specie ad eccezione di *P. aeruginosa*. L'attività *in vitro* dimostrata da TIG suggerisce che questo farmaco possa essere considerato una promettente alternativa nel trattamento delle infezioni gravi causate dai patogeni di più frequente riscontro clinico.

198

STUDIO SULLA PRESENZA DI HERPESVIRUS IN DONATORI DI CUTE DESTINATA A TRAPIANTO DI TESSUTO

Scarasciulli M.L.*, Calvario A[^], Di Lonardo A.*, Maggio G.*, Ventola C. [^], Satalino M. [^], Pascone M.*,

*U.O. Chirurgia Plastica Sez. Centro Ustioni-Banca Pelle
Università Policlinico, P.zza G. Cesare, 11 70124 Bari Italia
[^] U.O. Igiene II Lab. Virologia Diretta - Policlinico
P.zza G. Cesare, 11 70124 Bari Italia

Introduzione. Nonostante l'adeguamento dell'Italia alle normative europee circa la regolamentazione delle banche dei tessuti verso elevati standard di qualità, rimane reale il rischio di trasmissione di infezioni virali, in particolare da herpesvirus, attraverso l'impiego di cute di cadavere allogeneica per la ricostruzione chirurgica dei pazienti gravemente ustionati.

In letteratura i dati relativi a questo problema sono pochi, datati e riguardanti modelli animali. Lo studio si propone di documentare l'eventuale presenza di virus erpetici HSV1, HSV2, CMV, EBV, VZV, HHV6, HHV8 sia su cute allogeneica fresca che criopreservata proveniente da pazienti sani di cui viene valutata anche la copertura immunitaria verso i virus su menzionati.

Materiali e metodi. Sono stati arruolati 22 pazienti, ospedalizzati presso l'U.O. di Chirurgia Plastica per interventi di chirurgia riduttiva. Dopo consenso informato e selezione dei donatori sulla base dei criteri di inclusione dei donatori multiorgano, sono stati prelevati lembi di cute proveniente da scarti chirurgici e avviati ad indagini in immunoistochimica e biologia molecolare mediante Real Time PCR e nested PCR (Nanogen Advanced Diagnostics Srl) su prelievi biotipici. In parallelo sulle biopsie opportunamente criocongelate è stata valutata l'eventuale presenza virale. Inoltre in fase pre-operatoria sono stati analizzati in biologia molecolare campioni ematici (siero e PBLs), urine e gargarizzato dei pazienti arruolati.

Risultati e conclusioni. Dallo studio è emerso che l'81.8% dei pazienti sono positivi per almeno un virus in studio e su almeno uno dei campioni analizzati, con maggiore frequenza per HSV1 e HHV8 in campioni di siero, PBLs e gargarizzato, quest'ultimo con viral load frequentemente più alto (>500 gv/ml). Delle 66 biopsie testate in triplo, il 45.4% ha mostrato positività per HSV1, HHV8 e VZV, associata a viral load mai superiore ai 100 gv/campione. Delle 39 biopsie a fresco risultate positive solo lo 0.4% ha confermato la positività nelle rispettive biopsie criopreservate.

In mancanza di una threshold di riferimento che correli il viral load con la trasmissibilità virale e la significatività clinica e in attesa di ulteriori approfondimenti sulla problematica, un'accurata selezione del donatore multiorgano è altamente raccomandata.

199

MONITORAGGIO VIROLOGICO ED IMMUNOLOGICO IN PAZIENTI RICEVENTI TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI (ASCT)

Tedeschi R., Berton M., Pratesi C., Pin E., Marus A., Bortolin M.T., Caffau C., *Simonelli C., Zanussi S. e De Paoli P.

S.O.C. di Microbiologia-Immunologia e Virologia,
*Oncologia Medica A, Centro di Riferimento Oncologico, IRCCS,
Via Pedemontana Occidentale, 12-33081 - Aviano (PN) - Italy

Introduzione. Un razionale monitoraggio virologico ed immunologico nei pazienti immunodepressi sottoposti a trapianto riveste un ruolo primario al fine di prevenire l'insorgenza di complicazioni e/o patologie importanti. Scopo dello studio è presentare i dati virologici ed immunologici relativamente alla nostra casistica di pazienti sottoposti a ASCT, per sottolineare l'importanza del monitoraggio dell'infezione da CMV e valutarne l'impatto sulla sopravvivenza post-ASCT.

Metodi. Pazienti: 36 pz, (23 NHL, 7 MM, 4 HD, 1 LMA, 1 sarcoma; 7/36 HIV+) sono stati arruolati (T0) e sottoposti a chemioterapia e G-CSF. Le cellule staminali emopoietiche venivano quindi raccolte (T1) e, dopo chemioterapia ad alte dosi (T2), venivano reinfuse (T3); tempi di follow-up successivi: a circa uno (T4), 3 (T5), 6 (T6) e 12 mesi da ASCT. Vengono presentati i dati relativi a T0 e T4.

Valutazione CMV: antigenemia pp65 (Biotest) e CMV DNA real time PCR (Artus).

Valutazione immunologica: studio sottopopolazioni linfocitarie in citofluorimetria.

Risultati. Ad un mese da ASCT 17/36 pz erano CMV pp65+ (mediana 1 cell, range 1-24). 1 pz HD si sono positivizzati più precocemente (mediana: 7 giorni). Le mediane CD4 e CD8 nei pz HD (101 e 208 cell/mm³) erano più elevate rispetto ai pz NHL (76 e 83 cell/mm³) e MM (44 e 22 cell/mm³). La diminuzione dei valori assoluti dei CD4 e CD8 rispetto a T0 era paragonabile nei gruppi di pz CMV pp65+ e pp65-. E' risultata una buona correlazione tra positività CMV DNA e pp65 (R²=0.97). 2/4 pz pp65- esaminati sono risultati CMV DNA positivi.

Conclusioni.

- 1) dopo ASCT, la cinetica dell'immunoricostituzione non influisce sulla positività dell'antigenemia CMV;
- 2) dopo 7-15 giorni da ASCT (aplasia) è utile un monitoraggio più attento, anche in relazione alla patologia;
- 3) il test per l'antigenemia CMV è nella nostra realtà di semplice esecuzione ed adeguato nel follow-up di pz sottoposti a ASCT tuttavia la valutazione quantitativa di CMV DNA sembra rivelare più precocemente la positività.

200

SORVEGLIANZA DELL'INFEZIONE /MALATTIA DA TOXOPLASMA GONDII IN PAZIENTI TRAPIANTATI DI ORGANO SOLIDO TORACICO

Genco F., Meroni V., Sarchi E., Castiglioni B., DiMatteo A., Zerrilli E., Minoli L.

Dipartimento di Clinica di Malattie Infettive
Università degli Studi Pavia
IRCCS Policlinico San Matteo Pavia
Via Taramelli, 5 27100 Pavia

Introduzione. L'infezione da *Toxoplasma gondii* è una possibile complicanza nei pazienti trapiantati di organo solido toracico in Europa dove la sieroprevalenza è alta. La toxoplasmosi può essere causata dalla presenza di cisti nel cuore trapiantato in un ricevente sieronegativo oppure dalla riattivazione di una pregressa infezione di pazienti sieropositivi. Scopo dello studio è stato

- 1) valutare la frequenza di siero conversione per toxoplasmosi in riceventi sieronegativi di organo solido (cuore e/o polmone) con donatori sieropositivi (R-/D+) o sieronegativi (R-/D-).
- 2) Verificare l'efficacia della chemioprolifassi in R-/D+ e della profilassi igienico alimentare in tutti i riceventi sieronegativi.
- 3) Valutare le caratteristiche clinico sierologiche della malattia in tutti i pazienti infetti.

Metodi. Abbiamo valutato 114 riceventi sieronegativi sottoposti a follow-up clinico e sierologico dopo il trapianto per diversi intervalli di tempo (2 mesi- 14 anni) presso il Dipartimento di Malattie Infettive. I pazienti erano così suddivisi R-/D-: 50 pazienti follow-up da 2 a 198 mesi, 38 maschi, 36 cuore, 13 polmone, 1 polmone/fegato. Solo profilassi igienico alimentare.

R-/D+: 64 pazienti follow-up da 2 a 151 mesi, 46 maschi, 51 cuore, 13 polmone. Profilassi igienico alimentare e terapia con PYR+SUL per due mesi. Tutti i pazienti sono stati testati per anticorpi IgG IgM con i seguenti tests: ELISA IgG IgM (Diasorin Saluggia Italia), IgG ELFA (Biomerieux Marcy L'Etoile). In tutte le sospette sierconversioni anche con Toxo IgM ISAGA, Toxo IgG Avidity (Biomerieux Marcy L'Etoile France), IgA Elisa (Diasorin Saluggia Italia), IgG IgM Western-Blot (LDBIO Lyon France). Nei casi sintomatici è stata anche eseguita una nested PCR con gene target AF 487580 (Clonit Milano Italia).

Risultati. Sono mostrati nella seguente tabella

	R- / D+	R- / D-	Tot
Sieroconversioni	14 (22%)	5 (10%)	19
no sieroconversioni	50	45	95
Tot	64	50	114

Conclusioni. Nel nostro studio non abbiamo osservato nessuna differenza statisticamente significativa tra pazienti R-/D- R-/D+ per quanto concerne la frequenza di sierconversioni, tuttavia la piccola dimensione campionaria riduce l'accuratezza statistica. I nostri dati confermano anche l'efficacia dei due mesi di chemioprolifassi nei pazienti R-/D+. R-/D- devono seguire profilassi igienico alimentare e ripetere prelievi ogni 6 mesi per verificare al più presto la sierconversione. Tutti i pazienti R-/D+ devono seguire la profilassi igienico alimentare e fare la chemioprolifassi per almeno due mesi.

201

MONITORAGGIO DELLA PROFILASSI PER LA TUBERCOLOSI LATENTE IN PAZIENTI TRAPIANTATI CON IL TEST T SPOT-TB

Arosio M.¹, Bargiggia G.¹, Rizzi M.², Nozza F.¹, Grigis A.¹, Goglio A.¹.

¹USC Microbiologia e Virologia,
²Malattie Infettive,
A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo, Largo Barozzi 1.

Introduzione. Negli ultimi anni sono stati introdotti test che permettono la rilevazione della citochina IFN- γ prodotta dai linfociti a seguito della stimolazione con antigeni specifici di *M. tuberculosis*. Tra questi il test T SPOT-TB (distribuito in Italia da Nanogen) che utilizza gli antigeni ESAT-6 e CFP-10 presenti nella regione RD1 del genoma tubercolare e che dimostra sensibilità e specificità maggiore del test tuberculinico in particolare nei confronti dei pazienti con sistema immunitario compromesso (terapie immunosoppressive, HIV-positivi), nei bambini e negli anziani, soggetti in cui il test cutaneo risulta a volte dubbio o negativo.

Lo scopo del presente lavoro è stato di monitorare l'effetto della profilassi antitubercolare sulla risposta T cellulare agli antigeni specifici di *M. tuberculosis*.

Pazienti e metodi. Nel giugno 2005, a seguito del riscontro di un caso di tubercolosi in Gastroenterologia ed uno in Medicina, 22 pazienti afferenti alle USC di Gastroenterologia e Medicina, immunodepressi per patologie varie, sono stati sottoposti a screening con T SPOT-TB (T-0). Solo per i negativi, il test veniva ripetuto a distanza di un mese (T-1, due mesi dalla esposizione) e ricontrollati i pazienti positivi dopo un periodo di sei mesi in profilassi con isoniazide (T-2).

Risultati. Dal gruppo indagato, 7 pazienti (range d'età 49 – 68 aa.) sottoposti a terapia immunosoppressiva per trapianto di fegato (< 6 mesi fino a 4 anni) sono risultati positivi al T SPOT-TB. I risultati sono esposti nella tabella seguente.

Casi	T-0		T-1		T-2	
	Esito	ESAT 6 – CFP 10	Esito	ESAT 6 – CFP 10	Esito	ESAT 6 – CFP 10
GP	POS	7 - 9	-	-	Neg	1 - 2
DF	Neg	0 - 0	POS	5 - 8	Neg	1 - 0
MS	Neg	2 - 5	POS	15 - 15	Neg	3 - 0
GF	POS	3 - 7	-	-	Dubbio	2 - 6
FQ	POS	25 - 25	-	-	POS	>50 - >50
AM	POS	2 - 9	-	-	POS	11 - 12
GT	POS	8 - 18	-	-	POS	49 - 27

Conclusioni. I dati ottenuti confermano quanto già pubblicato in Letteratura: una progressiva riduzione delle cellule T specifiche che potrebbe correlare con l'efficacia della profilassi/terapia. Nel nostro studio questo fenomeno si osserva nei pazienti con un numero di spot: ≤ 15 anche se questo criterio non trova conferma in un paziente che continua a rimanere positivo. L'esiguità del campione indagato non consente conclusioni esaustive in merito alla validità del test T SPOT-TB per il monitoraggio del trattamento della tubercolosi latente e pertanto ulteriori studi sono richiesti.

202

CONFRONTO TRA DUE SAGGI DI REAL-TIME PCR ED UNA NESTED PCR PER LA DIAGNOSI DI TOXOPLASMOSI

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

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

Introduzione. In questo studio sono stati valutati due saggi di Real-time PCR ed un saggio di nested PCR per la diagnosi molecolare di toxoplasmosi da applicare nei casi dove la diagnosi sierologica potrebbe essere di difficile interpretazione.

Metodi. Campioni biologici sperimentalmente addizionati di tachizoiti di *T.gondii* coltivati in cellule VERO e opportunamente diluiti, sono stati utilizzati per valutare la sensibilità di due Real-time PCR ("TaqMan" e "FRET") e di una nested PCR, aventi come bersaglio una regione di 529 pb, ed i geni 18S RNA e B1 di *T.gondii*, rispettivamente.

La specificità è stata valutata sottoponendo agli stessi saggi DNA di *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Leishmania infantum*.

Sono stati anche saggiati mediante nested-PCR 46 campioni biologici (16 liquidi amniotici, 13 campioni di sangue, 7 liquor, 7 biopsie tissutali e una da linfonodo e 2 campioni di umor vitreo) di donne gravide o pazienti immunodepressi con sospetta infezione da *T.gondii*.

Risultati. La sensibilità analitica è risultata 10^3 tachizoiti/ml (nested e Real-time PCR "TaqMan") e 10^2 tachizoiti/ml ("FRET"). Nessun segnale di PCR è stato osservato saggiando il DNA di *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Leishmania infantum*.

Tre dei 46 campioni esaminati (2 liquor, 1 biopsia cerebrale) sono risultati positivi per la presenza del DNA di *T.gondii*.

Conclusioni. I saggi di PCR valutati sono sensibili e specifici; in particolare, la FRET-PCR è risultata la più sensibile, probabilmente a causa del maggior numero di copie della sequenza bersaglio presenti nel DNA di *T.gondii*.

I saggi di Real-time PCR sono di semplice esecuzione e forniscono risultati in tempi più brevi rispetto ai sistemi convenzionali di PCR, riducendo anche il rischio di contaminazione, rendendone così utile l'applicazione in campo diagnostico soprattutto nella nostra realtà in cui nel 2005 la prevalenza dell'infezione da *Toxoplasma gondii* rilevata su sieri di 3.997 soggetti è stata del 31.57%.

203

REAL-TIME-PCR PER LA QUANTIZZAZIONE DI CMV-DNA DA SANGUE INTERO NEL FOLLOW-UP DI PAZIENTI TRAPIANTATI

Varetto S.; Pittaluga F.; Giliberto G.; Martelli S.; Gabella S.;
Alicce T.; Ghisetti V.; Marchiaro G.

S.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di
Torino, c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

Introduzione. Nel trapianto d'organo, il monitoraggio dell'infezione da CMV mediante la ricerca dell'antigene pp65 è

il gold-standard per la diagnosi e il trattamento precoce dell'infezione che si associa, in molte realtà di laboratorio, alla determinazione del CMV-DNA che è più precoce. I recenti metodi di Real-Time-PCR offrono una quantizzazione in tempi rapidi e range dinamico più ampio dei tradizionali metodi end-point, ma manca ancora una standardizzazione della matrice biologica di partenza e dell'estrazione del DNA. Lo scopo del lavoro è stato di valutare e confrontare con l'antigenemia un sistema Real-Time-PCR (AmpliMedical, To) per CMV-DNA applicato a sangue intero (200 ul) mediante estrazione completamente automatizzata basata su tecnologia dell'affinità degli acidi nucleici per gel di silice (Qiagen, Mi). **Metodi.** Sono stati analizzati 388 campioni per CMV-DNA e pp65-antigenemia, provenienti da 128 pazienti (100 con infezione CMV, di cui 28 in trattamento pre-emptive, 72 non trattati, e 28 senza infezione) sottoposti a trapianto d'organo solido e di midollo

Risultati. La correlazione tra Real-Time-PCR e antigenemia è stata buona ($r=0,648$). Per valori di antigenemia corrispondenti a 0, da 1 a 10, da 11 a 20, da 21 a 50, da 51 a 100 e > 100 cellule pp65 positive /200.000 leucociti, la mediana dei valori di CMV-DNA è stata rispettivamente di 3,3; 3,9; 4,5; 4,6; 5,0 e 5,9 \log_{10} /ml. Un plasmide (Clonit, MI.) recante la regione amplificata IE a concentrazione nota è stato usato per testare la sensibilità (100% alla concentrazione di 100 copie in amplificazione e 100% per 5000 copie in estrazione) e la riproducibilità del sistema di estrazione e amplificazione (CV tra serie $<19\%$). La percentuale di inibizione è stata del 2%.

Conclusione. La determinazione di CMV-DNA da sangue intero mediante Real-Time-PCR è risultata altamente riproducibile e sensibile, semplificando e accelerando il processo di quantizzazione di CMV-DNA per scopi clinico-terapeutici.

204

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI INSORGENZA DI NEFROPATIA ASSOCIATA A POLYOMAVIRUS NELLO SCREENING DI TRAPIANTATI RENALI

Cricca M.^{1,2}, Venturoli S.¹, Ambretti S.¹, Gentilomi G.¹,
Liviano D'Arcangelo G.³, Capelli I.³, Scolari M.P.³,
Musiani M.¹, Zerbini M.¹

¹D.M.C.S.S. - Divisione di Microbiologia, Università di Bologna,

²C.R.E.M.M. - Azienda Ospedaliera S.Orsola Malpighi;
Via Massarenti 9, 40138 Bologna

³Unità Operativa di Nefrologia Dialisi e Trapianto
- Azienda Ospedaliera S.Orsola Malpighi; Via Massarenti 9,
40138 Bologna

Introduzione. La nefropatia da polyomavirus (PVAN) è una patologia emergente nei trapiantati renali caratterizzata da malfunzionamento e perdita d'organo nell'8% dei casi. L'associazione con la nefropatia è dimostrata per BKV, mentre è ancora da dimostrare per JCV. Attualmente la presenza di una elevata carica di DNA di BKV nelle urine e soprattutto nel plasma di trapiantati di rene è considerata predittiva dell'insorgenza di PVAN.

In questo studio abbiamo messo a punto un saggio di PCR quantitativa per la ricerca di BKV e JCV in urina e plasma di trapiantati renali allo scopo di modulare la terapia antirigetto e ridurre così il rischio di insorgenza di PVAN.

Metodi. È stato allestito un saggio di Real Time PCR per la

contemporanea amplificazione e tipizzazione di BKV e JCV utilizzando lo strumento Rotor-Gene e sonde TaqMan. Inoltre è stato inserito un bersaglio sintetico (EC01) a concentrazione nota a monte del processo di estrazione e la resa dell'estrazione è stata ottenuta quantificando l'EC01 estratto. In 89 trapiantati renali è stata valutata, a tempo 0 e nel follow-up post trapianto, la carica del DNA di BKV e JCV nell'urina e plasma. I pazienti sono stati poi suddivisi in gruppi di rischio in base alla positività a BKV e/o JCV su plasma e/o urina.

Risultati. Degli 89 pazienti seguiti, 13 (14,6%) hanno presentato, tra 6 e 12 mesi post trapianto, una viruria da BKV e/o JCV significativamente elevata ($>10^7$ copie/ml), suggestiva di possibile interessamento renale. Dei 13 pazienti, 6 hanno mostrato riattivazione da BKV, 6 da JCV e uno da entrambi i virus. Valutando la viremia, 3 dei 6 pazienti con infezione da BKV hanno mostrato valori significativi ($\geq 10^5$ copie/ml) mentre nessuno dei 6 pazienti con riattivazione da JCV ha mostrato valori di viremia significativi. Il paziente con riattivazione di entrambi i virus ha mostrato, a un anno dal trapianto, una viruria di $7,64 \times 10^9$ copie/ml e una viremia da BKV di $1,22 \times 10^6$ copie/ml. Nei successivi follow-up si è registrato un aumento della viremia ed un peggioramento dei parametri chimico-clinici (creatinina >2 mg/dl); sulla base di questi dati si è deciso di ridurre la terapia immunosoppressiva. A 3 mesi dalla riduzione della terapia i valori di viremia sono risultati ridotti di 2 logaritmi ($1,40 \times 10^4$ copie/ml).

Conclusione. Il saggio di Real time PCR TaqMan per lo screening di BKV e JCV in trapiantati renali si è rivelato utile nel valutare il rischio di insorgenza di PVAN e nel monitoraggio della fitness virale in seguito a riduzione della terapia. Resta ancora da valutare il significato clinico dell'infezione da JCV.

- redazione, verifica ed emissione di nuova documentazione conforme alla norma.

Gli obiettivi educativi erano rivolti a sviluppare capacità di:

- individuare responsabilità specifiche e definite
- dichiarare regole conformi e condivise
- produrre evidenze oggettive a fronte delle regole
- analizzare criticamente il proprio modo di operare alla luce di quanto prescritto dalla norma.

Il corso di FSC è stato progettato e proposto dal direttore di U.O. e dal responsabile scientifico al Servizio Formazione dell'Azienda per i Servizi Sanitari della provincia di Trento che, dopo valutazione in commissione provider, ha provveduto all'accreditamento. Nel settore di batteriologia sono stati coinvolti 4 dirigenti, il coordinatore tecnico e 11 tecnici di laboratorio. Il programma è stato articolato in 7 fasi da svolgere nell'arco di due mesi con un impegno preventivato di 20 ore a partecipante più un periodo di collaudo della documentazione sul campo della durata di un mese. Il corso prevedeva lo studio della documentazione dipartimentale, delle Istruzioni Operative (I.O.) in uso, seguito da un confronto della documentazione esistente con la norma tramite l'uso di una lista di riscontro e la rilevazione delle non conformità. L'attività era organizzata con due incontri in plenaria, studio individuale della documentazione e lavori a piccoli gruppi coordinati da due tutor con conoscenze specifiche nella gestione della qualità. Sono state elaborate 11 I.O. relative all'area della batteriologia. La FSC si è confermata una valida metodologia formativa che favorisce l'acquisizione di una mentalità aperta all'evidenza, alla collaborazione e alla ricerca continua di opportunità di miglioramento.

205

SISTEMA QUALITÀ E FORMAZIONE SUL CAMPO: ESPERIENZA DEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA DI TRENTO

Adamo T., Amari A., Bandera M., Caciagli P., Cainelli M., Caola I., Devitis A., Fedrizzi M., Filippi S., Menghini L., Ober P., Pederzoli L., Perfetti I., Rigoni A., Sartori R., Simione M.B., Trento M.

U.O. Microbiologia e Virologia, Ospedale di Trento

Nella U.O. Microbiologia e Virologia dell'Ospedale di Trento si sta implementando il sistema qualità ISO15189:2003, con una sequenzialità stabilita a livello dipartimentale. Per coinvolgere nel miglioramento il personale dell'U.O. è stato progettato e realizzato nel 2005 un corso di formazione sul campo (FSC) dal titolo: "Il miglioramento continuo della qualità: revisione della documentazione della fase analitica secondo i requisiti della norma ISO 15189". Gli obiettivi generali della formazione erano:

- conoscenza della norma
- individuazione di aree di miglioramento delle procedure analitiche esistenti; adeguamento alle più recenti evidenze scientifiche, a quanto dichiarato nel Manuale della Qualità, nelle procedure generali dipartimentali e ai requisiti della norma