

comunicazioni orali

SESSIONE I

Epidemiologia molecolare in microbiologia

Mercoledì 3 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, SALA BLU

CO1.1

METODO RAPIDO PER IDENTIFICARE I CEPPI DI CMV RESISTENTI AL GANCICLOVIR.

Allice T.¹; Cerutti F.¹; Varetto S.¹; Pittaluga F.¹; Giliberto G.¹; Mantelli S.¹; Lazzarotto T.²; Ghisetti V.¹

¹ S.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino, c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

² Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Ospedale S.Orsola Malpighi, Bologna

Introduzione. Un problema associato all'introduzione di misure di profilassi e di terapia precoce dell'infezione da CMV (basate sulla somministrazione prolungata di antivirali come ganciclovir (GCV) per via endovenosa e più recentemente per os), è dato dallo sviluppo di ceppi resistenti a GCV. Il 90% delle mutazioni che determinano la resistenza a GCV interessano il gene UL97 che codifica per la fosfotransferasi virale. E' importante ottenere dati rapidi sulla resistenza di CMV per poter scegliere un farmaco alternativo. Il nostro lavoro illustra un protocollo rapido di sequenziamento diretto, per l'identificazione di ceppi farmacoresistenti a partire direttamente dal sangue intero dei pazienti.

Metodi. Sono stati studiati 55 campioni di sangue intero, provenienti da 13 pazienti trapiantati di organo solido (n=7) e midollo allogenico (n=6), con infezione da CMV, che dopo periodi prolungati di pre-emptive therapy con GCV (una media di 8 settimane), avevano mostrato un innalzamento significativo dei valori di pp65 e CMV DNA.

Il protocollo di ricerca dei ceppi di CMV-resistenti a GCV prevede una reazione nested-PCR, per l'amplificazione della regione UL97 (dal codone 439 a 641) di CMV, sequenziamento diretto della regione amplificata seguito da analisi delle sequenze e confronto con

sequenza di riferimento AD169.

Risultati. La sensibilità del protocollo è di 30 copie di genomi/reazione. 5/13 pazienti presentavano mutazioni nel gene UL97; in 3 pazienti queste erano associate a resistenza al GCV (M460V, A594V e L595S); 2 pazienti presentavano mutazioni con incerto impatto di resistenza (1 Q449K e 1 C603F); un solo paziente presentava una mutazione silente (L447F).

Conclusione. Il protocollo sviluppato permette di identificare la presenza di ceppi di CMV resistenti al GCV, in tempi rapidi e con una buona sensibilità.

CO1.2

PRESENZA DEL PAPILLOMAVIRUS (HPV) AD ALTO RISCHIO ONCOGENO IN UN CANCRO DELLA LARINGE E IN UNA METASTASI.

Giannattasio A.¹, Panetti G.², Fierro P.², Falco E.¹, Smeraglia R.³, Ingala F.¹

¹Virologia-P.O.Ascalesi - ASLNa I - Napoli;

²Otorinolaringoiatria - P.O Ascalesi - ASLNa - Napoli;

³Microbiologia e Virologia - A.O.R.N. Monaldi - Napoli.

Introduzione. Diversi studi hanno dimostrato una relazione tra il Papillomavirus (HPV) e le lesioni benigne e/o maligne del cavo orale. Il nostro gruppo ha rilevato la presenza di un HPV ad alto rischio oncogenico sia in un cancro della laringe che in una metastasi linfonodale colliquata dello stesso soggetto.

Metodi. il DNA è stato estratto da tessuto paraffinato proveniente dal carcinoma laringeo e dal tessuto metastatico. Successivamente è stata amplificata la regione L1 (450bp) del genoma virale di HPV, utilizzando i consensus primers MY9/11. I prodotti della PCR sono stati rilevati su gel di agarosio e genotipizzati mediante ibridazione inversa su micropiastra (Nanogen spa).

Risultati. I prodotti della PCR hanno rivelato la presenza in entrambi i tessuti di HPV. Nel caso della laringe si tratta di un HPV 18, mentre nel tessuto metastatico la genotipizzazione ha mostrato la presenza di una coinfezione HPV 16-31-45.

Conclusioni. I risultati ottenuti da un lato confermano il probabile nesso causale tra HPV e lesioni del cavo orale e, dall'altro sembrerebbero dimostrare che questo virus è presente anche in tessuti diversi dagli epiteli e le mucose.

CO1.3

EVOLUZIONE DELLE ESBL IN ITALIA: DIFFUSIONE DI UN CEPPLO DI *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CTX-M-15 E MULTI-RESISTENTE

Mugnaioli C.¹, Bassano M.², Brecciaroli F.³, Frontini P.⁴, Ghiandoni M.G.⁵, Migalli A.⁶, Verna G.⁴, Manso E.⁴, Rossolini G.M.¹

¹Dipartimento di Biologia Molecolare,

Università degli Studi di Siena.

²Ospedale di San Severino Marche.

³Ospedale di Jesi.

⁴Laboratorio di Microbiologia degli Ospedali Riuniti di Ancona.

⁵Ospedale di Fano.

⁶Ospedale di Senigallia.

Introduzione. Le β -lattamasi a spettro-esteso (ESBL) svolgono nelle *Enterobacteriaceae* un ruolo cruciale come determinanti di resistenza alle cefalosporine a spettro esteso. Recentemente le ESBL del tipo CTX-M si sono rapidamente diffuse in diversi ambienti. La diffusione a livello italiano di questi enzimi in *Escherichia coli* è risultata notevole (54,8% dei produttori di ESBL) mentre in *Klebsiella pneumoniae* la loro prevalenza è molto più limitata (12,3% dei produttori di ESBL). In questo lavoro abbiamo descritto la rapida diffusione a livello regionale di un ceppo multi-resistente (MDR) di *K.pneumoniae* produttore di CTX-M-15.

Metodi. La chemiosensibilità è stata analizzata come raccomandato dal CLSI. La clonalità degli isolati è stata stabilita attraverso RAPD. I determinanti ESBL sono stati rilevati per mezzo della PCR e sequenziamento degli ampliconi. Il trasferimento dei geni di resistenza è stato saggiato attraverso esperimenti di coniugazione. La caratterizzazione plasmidica è stata effettuata attraverso l'analisi RFLP.

Risultati. Durante il periodo ottobre 2005 - giugno 2006, 65 isolati di *K.pneumoniae* consecutivi nonreplacati, ESBL positivi e con un fenotipo MDR (resistenza ai β -lattamici eccetto i carbapenemi, agli aminoglicosidi ed ai fluorochinoloni), sono stati inviati al Laboratorio di Clinica Microbiologia regionale della

regione Marche da otto diversi ospedali. La maggior parte degli isolati proveniva dai reparti di rianimazione, mentre una minoranza da quelli di medicina e chirurgia. L'analisi RAPD ha stabilito la relazione clonale fra gli isolati, che sono risultati tutti positivi per la presenza del gene *bla*_{CTX-M-15}. *Bla*_{CTX-M-15}, codificato da un plasmide coniugativo, è stato efficientemente trasferito in *E.coli* (frequenza di coniugazione nell'ordine di 10⁻⁴ transconiugante per ricevente). Attraverso l'analisi RFLP, i plasmidi codificanti per il gene *bla*_{CTX-M-15} sono risultati apparentemente uguali in tutti gli isolati.

Conclusioni. I risultati di questo studio hanno sottolineato l'abilità di diffusione che può avere un clone di *K.pneumoniae* MDR, che ha acquisito un determinante di resistenza CTX-M-15.

comunicazioni orali

SESSIONE 2

Nuovi sviluppi e prospettive nel campo dei vaccini, degli antivirali e dell'infezione da HIV

Mercoledì 3 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

CO2.1

UTILIZZO DI UN PANNELLO MOLECOLARE PER LA DIAGNOSI Eziologica DELLE INFEZIONI RESPIRATORIE ACUTE VIRALI

Minosse C.¹, Zaniratti M.S.¹, Selleri M.¹, Pisciotto M.¹, Chiappini R.¹, Carletti F.¹, Gualano G.³, Bevilacqua N.³, 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 sono implicati nella eziologia delle affezioni respiratorie acute. Applicando un ampio pannello molecolare, abbiamo confrontato la presenza di tali agenti nel periodo di massima morbilità (febbraio-aprile) del 2006 e del 2007.

Metodi. Nei periodi febbraio-aprile 2006 e 2007 sono stati raccolti 33 e 42 tamponi nasofaringei da pazienti rispondenti alla definizione di ILI. Inoltre sono stati considerati 27 campioni provenienti da pazienti ospedalizzati nel periodo 30/11/06-11/4/07 per malattie respiratorie acute.

La ricerca molecolare è stata eseguita per influenza A e B, parainfluenza 1-2-3, respiratorio sinciziale, metapneumovirus, rhinovirus, coronavirus OC43, 229E, NL63, adenovirus.

Risultati. La frequenza tamponi positivi ad almeno un virus nel 2006 e 2007 era 72,7% e 59,5%, con una doppia positività nel 21,2% e nel 0,5% dei casi, rispettivamente, comprendente generalmente un rhinovirus. Nel

2006 sono stati individuati 11 casi di influenza (33,3%, 9 A e 2 B), e nel 2007 13 casi di influenza (30,9%), 9 A e 4 B. In totale solo 6/24 (25%) casi di influenza sono stati rilevati dal test rapido, tutti di tipo A.

Nel terzo gruppo, tutti i campioni sono risultati positivi ad almeno un virus, di cui 4 (14,8%) in coinfezione (3 con un rhinovirus); sono stati identificati 6 casi di influenza A e 1 di influenza B.

Nel complesso, i virus più frequenti sono risultati i rhinovirus (45/102 casi, 44,1%), seguiti dall' influenza A (23,5%), per la maggior parte H3N2. Nel 2007 5 casi (11,9 %) erano positivi a coronavirus (3 OC43, 2 NL63), nessuno nel 2006.

Conclusioni. Diversi virus sono frequentemente rilevabili nelle forme respiratorie acute. E' necessario valutare su una casistica più estesa ed in distinti contesti assistenziali l'utilità clinica di pannelli molecolari allargati per la diagnosi eziologica delle forme respiratorie acute, al fine di confermare e/o escludere la loro eziologia virale.

CO2.2

FATTORI ASSOCIATI CON I PATTERN DI RESISTENZA GENOTIPICA DI HBV ALLA LAMIVUDINA: GENOTIPO HBV E STATO HIV

Solmone M., Vairo F., Vincenti D., Iacomi F., Mariano A., Piselli P., Capobianchi M.R., Puro V, Ippolito G., Antonucci G.

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L.Spallanzani", IRCCS, Roma

Introduzione. La coinfezione con HBV e HIV è molto frequente. Si sa poco sulle differenze esistenti tra pazienti HIV⁺ e HIV⁻ nello sviluppo di mutazioni di HBV che danno resistenza alla lamivudina (LAM). Inoltre, non è chiaro il ruolo del genotipo dell'HBV nel

pattern di mutazioni.

Metodi. In una coorte di 84 pazienti HBsAg+, che avevano effettuato il test di lamivudina-resistenza, abbiamo analizzato retrospettivamente la frequenza delle principali mutazioni ed i fattori associati. Le mutazioni sono state rilevate mediante sequenziamento (posizioni 125-214 della trascrittasi inversa), ed il genotipo dedotto mediante confronto con sequenze di riferimento.

Risultati. 38 (45.2%) erano HIV+ e tossicodipendenti, la mediana della durata del trattamento era simile nei due gruppi: 24 e 26 mesi in HIV+ vs HIV-, tenendo conto del differente dosaggio del farmaco. I genotipi avevano la seguente distribuzione: A (N=25), D (N=13) nei pazienti HIV+ ed A (N=7), D (N=39) negli HIV- ($p<0.0001$). Dodici pazienti HIV+ e 13 HIV-, albergavano virus wild type. La probabilità di sviluppare mutazioni era fortemente associata alla durata di esposizione alla LAM ($p=0.001$) ma non alla presenza di HIV ed al genotipo HBV. Cinquantanove pazienti, 26 HIV+ (68%) e 33 HIV- (72%), presentavano le mutazioni associate a LMV-resistenza. Negli HIV+ era più frequente il pattern M204V+L180M+V173L rispetto agli HIV- ($p=0.003$). La presenza di M204V (da sola o con L180M o/e V173L) era fortemente associata con HIV+, genotipo A e assenza di HBeAb ($p=0.0001$; $p=0.004$; $p=0.028$). All'analisi multivariata solo la presenza di HIV e la durata della terapia rimanevano indipendentemente associate alla presenza di M204V ($p=0.03$, $p=0.036$).

Conclusioni. Fattori dipendenti da HBV o dall'ospite sono coinvolti nello sviluppo delle mutazioni di resistenza: M204V sembra comparire più frequentemente nei soggetti HIV+, dopo un periodo di trattamento più prolungato. Anche il genotipo HBV può avere un ruolo predisponente.

CO2.3

PERSISTENZA DI HPV AD ALTO RISCHIO ONCOGENEO E RECIDIVA DI MALATTIA IN DONNE IONIZZATE PER CERVICOCARCINOMA

Venturoli S.¹, Ambretti S.¹, Cricca M.¹, Leo E.¹, Marra E.², Costa S.², Musiani M.¹, Zerbini M.¹

¹D.M.C.S.S. – Divisione di Microbiologia, Università di Bologna. Via Massarenti 9, 40138, Bologna.

²U.O. Ginecologia e Ostetricia, Azienda Ospedaliera S.Orsola-Malpighi. Via Massarenti 9, 40138, Bologna.

La prevenzione del cervicocarcinoma è affidata a una precoce diagnosi e a un efficace trattamento delle neoplasie cervicali intraepiteliali di alto grado (CIN2+). Donne conizzate per CIN2+ necessitano inoltre di

essere seguite in un follow up (FU) regolare al fine di monitorare eventuali recidive. Il fallimento del trattamento di rimozione si verifica infatti, in media, nel 10,2% delle pazienti trattate. Non esiste un generale consenso sugli intervalli e sulla durata del FU. Dati recenti indicano i test per la ricerca del DNA di HPV ad alto rischio (HR-HPV) quali metodi più veloci e sensibili, oltre che ugualmente specifici rispetto alla citologia, nel FU di queste pazienti.

Obiettivo del nostro studio è stata la valutazione della persistenza HR-HPV 6 mesi dopo conizzazione, in donne con diagnosi di carcinoma microinvasivo, quale fattore predittivo di malattia residua.

Sono state inserite nello studio 36 pazienti (età media 38,6 anni) con cervicocarcinoma microinvasivo documentato istologicamente su cono [20 IA1<1mm, 13 IA1>1mm, 1 IA2 e 2 IB1].

Tutte le pazienti sono risultate positive per HR-HPV DNA prima del trattamento (t0). Il 60,1% è risultato positivo ad HPV16, il 14,3 ad HPV33 e il 10,7 ad HPV18. Di tutte le pazienti positive per HPV16 sono stati valutati lo stato fisico e la carica virale al fine di evidenziare una correlazione con la persistenza virale e la recidiva di malattia.

Tutte le pazienti sono state sottoposte a esame virologico a 6 mesi post-conizzazione (t1) e la persistenza virale è risultata del 60,7% (64,7% HPV16). La persistenza non ha mostrato correlazione significativa con il coinvolgimento dei margini, infatti il virus persiste nel 30,8% dei margini liberi e nel 60,0% dei margini coinvolti. I dati della persistenza virale sono stati infine messi in relazione con l'incidenza della malattia residua entro 24 mesi: in circa il 30,0% dei casi si è avuta una recidiva e in tutti questi è stata riscontrata la persistenza del genotipo virale identificato al t0. Inoltre lo stato integrato sembra essere correlato con la persistenza virale e con la recidiva di malattia.

In conclusione, in pazienti con cervicocarcinomi microinvasivi la persistenza virale a 6 mesi ha mostrato un elevato valore predittivo di recidiva. Per quanto riguarda i carcinomi positivi a HPV16, altri parametri quali lo stato fisico e la carica virale potrebbero essere presi in considerazione nella valutazione del rischio di CIN ricorrenti.

comunicazioni orali

SESSIONE 3

Simposio intersocietario AMCLI-FADOI

Mercoledì 3 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, SALA BIANCA

CO3.1

LA DIAGNOSI DI POLMONITE ATIPICA DA MYCOPLASMA PNEUMONIAE E CHLAMYDIA PNEUMONIAE: METODI A CONFRONTO

Garlaschi M.C., Daprai L., Affini E., Ronchi M., Monasteri M.F., Luppi B., Follesa A., Ramponi C., Brighenti A., Torresani E.

Laboratorio Centrale Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia. Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano

Introduzione. *Mycoplasma* e *Chlamydia pneumoniae* sono gli agenti eziologici delle "polmoniti atipiche".

La *Nested PCR* e la *Real Time PCR* sono tecniche entrate nella routine diagnostica, con specificità e sensibilità superiori a tutte le altre analisi.

Scopo del nostro studio è il confronto fra la ricerca degli anticorpi e la tecniche di amplificazione genica.

Metodi. La ricerca del DNA batterico nei campioni di 100 pazienti (44 broncoaspirati, 27 espettorati, 16 broncolavaggi alveolari, 5 liquidi pleurici, 5 prelievi ematici, 2 tamponi faringei e 1 aspirato naso-faringeo) è stata condotta mediante *Nested-PCR* (Nanogen). Di questi pazienti, 43 sono stati sottoposti alla ricerca di anticorpi IgG, IgM nel sangue (EIA - Technogenetics).

Risultati. 11 pazienti (11%) sono risultati positivi in *Nested-PCR* per *M.pneumoniae*, 7 pazienti (7%) per *C.pneumoniae*. In 24 pazienti (55.8%) la sierologia supporta il risultato ottenuto in *Nested*.

In 17 pazienti (39.5%) la *Nested* è negativa mentre la sierologia risulta positiva per le IgG (infezione pregressa); 2 pazienti (4.7%) hanno una sierologia negativa a fronte di un risultato positivo in *Nested*, probabilmente perché l'amplificazione genica evidenzia la presenza del batterio prima che le IgM siano dimostrabili nel siero.

Conclusioni. La sierologia batterica è utile soprattutto nelle infezioni da *Mycoplasma* e *Chlamydia pneumoniae* pregresse o croniche, ma fornisce solamente supporto anche se valido nella diagnosi di infezioni in atto. La ricerca del DNA batterico è invece un indice inequivocabile della presenza del microrganismo. Fornisce inoltre una chiara indicazione del successo della terapia antibiotica.

Abbiamo messo a confronto i risultati ottenuti in *Nested PCR* con una tecnologia più recente, la *Real Time PCR* (Nanogen), rapida e di facile lettura. L'analisi, condotta su 21 pazienti, ha confermato nel 100% dei casi il risultato ottenuto in *Nested*.

CO3.2

APPLICABILITÀ DI TRICHOME BLUE STAIN PER IDENTIFICAZIONE DI MICROSPORIDI ED OPPORTUNISTI ENTERICI

Fabbro E.¹, Arzese A.^{1,2}, Vici A.^{1,3}, Tavio M.¹, 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

³Intitut Universitarie et Technologique de l'IUT A, Lille 1, F.

Introduzione. Delle oltre 1000 specie di microsporidi note, 11 sono oggi riconosciute responsabili di infezioni nell'uomo; Le microsporidiosi da *Enterocytozoon* ed *Encephalitozoon*. interessano soprattutto i pazienti in AIDS, dove sostengono diarree croniche e cheratocongiuntiviti con range di prevalenza molto ampio (7% - 50%). La diagnosi di microsporidiosi è essenzialmente morfologica, mediante colorazioni perma-

nenti dedicate su strisci fecali, e con indagine ultrastrutturale al microscopio elettronico come gold standard; le ridotte dimensioni degli organismi (1-3 µm), gli scarsi riferimenti morfologici discriminativi, e la necessità di applicare metodologie complesse rendono a tutt'oggi problematica la diagnosi di microsporidiosi. In questo studio si riporta l'esperienza relativa all'applicazione di una procedura di colorazione tricromica commerciale, per stabilirne l'efficacia e l'applicabilità a fini diagnostici in parassitosi enteriche da opportunisti.

Metodi. A partire da sedimenti fecali fissati in formalina veniva allestita colorazione tricromica -TBS- (Trichrome blue stain- MCC, CA), con utilizzo di fissativi a bassa tossicità (Hemo-De, Meridian Diagnostics, Milano). Venivano esaminati 32 sedimenti fecali raccolti in 3 anni a pazienti HIV-positivi con indicazione per esame coproparassitologico, e per i quali era già stata effettuata indagine per opportunisti enterici; in parallelo veniva ripetuta la colorazione acid-fast -KS- (Kinyoun stain kit, MCC-CA).

Risultati. In 1/32 casi (3%) la TBS individuava microsporidi, in soggetto sintomatico senza diagnosi pregressa conclusiva; in 4/32 casi entrambe le colorazioni evidenziavano oocisti di *Cryptosporidium spp*, in 2/32 oocisti di *Cyclospora spp*, ed in 1/32 oocisti di *Isospora spp*; al contrario della KS, con TBS venivano altresì evidenziati trofozoiti e cisti di *Giardia intestinalis*, *Blastocystis hominis*, ed *Endolimax nana*, mentre in entrambe le colorazioni non erano identificabili le specie del genere *Entamoeba*.

Conclusioni. L'applicazione della Trichrome blue stain pare promettente e relativamente rapida per diagnosi di parassitosi enteriche da opportunisti, a partire da campioni preparati secondo procedura standard; tuttavia, l'identificazione microscopica dei microsporidi rimane di difficile approccio.

CO3.3

LA PROCALCITONINA QUALE INDICATORE DI EFFICACIA DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA NELLE POLMONITI IN TERAPIA INTENSIVA

Riva I.¹, Amer M.¹, Passerini Tosi C.², Goglio A.², Marchesi G.¹

¹USC Anestesia 3°- TI Adulti, ²USC Microbiologia e Virologia, AO Ospedali Riuniti di Bergamo

Introduzione. La politica dell'antibioticoterapia ha una notevole rilevanza nella pratica clinica, per contenere sia la pressione selettiva che i costi, ottenendo lo stesso outcome.

In Terapia Intensiva (TI) la dimostrazione che il miglior outcome è correlato sia alla precocità del trattamento che alla sua efficacia, induce ad iniziare con un trattamento ad ampio spettro per poi limitare il numero degli antibiotici usati in base al risultato clinico e microbiologico.

Rimane tuttavia incerto il momento in cui attuare tale de-escalation therapy o in cui sostituire il trattamento perché inefficace; i parametri clinici e le indagini di laboratorio risultano talora insufficienti per sostenere una qualunque decisione.

Obiettivo. Valutare, attraverso uno studio osservazionale prospettico in singolo cieco, il possibile ruolo della procalcitonina (PCT) nella gestione dei malati con polmonite ricoverati in una TI per: la formulazione della diagnosi differenziale nei confronti di quadri clinici non sostenuti da infezioni batteriche (pancreatite, infezioni virali), la riduzione dei trattamenti antibiotici, la definizione della prognosi, la decisione di sostituire un trattamento perché inefficace o proseguirlo.

Metodi. La cinetica della PCT è stata seguita tramite determinazioni effettuate all'ingresso e in 3°, 5°, 8° giornata con un test in immunoenzimatico sandwich one step con rivelazione finale in fluorescenza (Vidas Brahms PCT, bioMérieux), su degenti affetti da polmonite, acquisita in comunità (CAP) o durante il ricovero (HCAP, VAP).

I clinici, non informati dei risultati, hanno definito il trattamento, le sue variazioni ed il giudizio clinico finale.

Risultati. Gli AA presentano i risultati preliminari di uno studio osservazionale, effettuato presso la TI degli Ospedali Riuniti di Bergamo, incluse la valutazione della sensibilità e specificità del valore di PCT nei vari punti della curva per identificarne la predittività.

comunicazioni orali

SESSIONE 4

Microbiologia clinica in geriatria

Giovedì 4 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

CO4.1

ENTEROBATTERI PRODUTTORI DI ESBL IN RESIDENTI NELLE RSA PORTATORI DI CATETERE VESCICALE

Gualdi P.¹, Collini L.¹, Schinella M.¹, Mariotti G.², Careddu N.³, Manara G.⁴, Pandolfo E.⁵, Ianielli V.⁶

¹Laboratorio Patologia clinica;

²Direzione Medica - Ospedale S. Maria del Carmine, P.le S. Maria 6 - 38068 Rovereto (TN);

³RSA Avio; ⁴RSA Brentonico; ⁵RSA Mori; ⁶RSA Rovereto

Introduzione. La prevenzione delle infezioni nelle strutture residenziali per anziani (RSA) costituisce un obiettivo sanitario di estrema rilevanza, infatti le RSA costituiscono un ambiente ideale per l'emergenza e la diffusione di microrganismi resistenti. In particolare, negli ultimi anni, nelle RSA si è assistito ad un aumento della prevalenza di Enterobatteri produttori di ESBL (Extended Spectrum β -Lactamase). In un più ampio programma di controllo delle infezioni, il laboratorio è in grado di attuare un monitoraggio dell'ecosistema batterico attraverso la coltura dei campioni biologici, l'isolamento dei microrganismi e il saggio della loro sensibilità agli antibiotici.

Metodi. L'osservazione dei dati delle RSA relativi al periodo 2004-2006 ha rilevato un trend di isolamento in costante aumento in quanto si è passati da una percentuale di ESBL del 22% nel 2004, 25% nel 2005 al 30% nel 2006.

Questa osservazione ha dato il via al nostro studio per valutare la circolazione di microrganismi produttori di ESBL nei residenti delle RSA della Vallagarina.

Risultati. Sono state coinvolte 4 RSA per un totale di 50 pazienti portatori di catetere vescicale, di cui 48 con urinocoltura positiva per uno o più batteri. Sono stati isolati 94 ceppi di Enterobatteri (33 *E.coli*, 25 *P.aeruginosa*,

10 *P.mirabilis*, 6 *P.stuartii*, 6 *K.pneumoniae*, 6 *M.morganii*, 2 *E.aerogenes*, 1 *E.cloacae*, 1 *S.marcescens*, 1 *C.braakii*) di cui 34 produttori di ESBL (36%).

Conclusioni. Le singole RSA si diversificano notevolmente per ciò che riguarda la percentuale di Enterobacteriaceae ESBL isolate con un range 44.4 %- 0%, confermando la distribuzione "a macchia di leopardo" caratteristica delle resistenze antibiotiche e probabilmente collegata anche al diverso consumo di cefalosporine di 3^a generazione.

Vista l'elevata percentuale di resistenze agli antibiotici riscontrata negli ultimi anni nei microrganismi provenienti dalle RSA, è importante prevedere collaborazioni che permettano un monitoraggio costante dell'ecologia batterica e l'andamento delle resistenze in queste strutture.

CO4.2

ENTEROBATTERI ESBL PRODUTTORI IN STRUTTURE DI LUNGODEGENZA (LTCF): PRIMO STUDIO ITALIANO DI PREVALENZA

Pagani L.¹, Goglio A.², Migliavacca R.¹, Spalla M.³, Regattin L.⁴, Nucleo E.¹, De Luca C.¹, Grigis A.², Brusaferrò S.⁴

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

²Microbiologia e Virologia, "Ospedali Riuniti", L.go Barozzi 1, 24128 Bergamo;

³Servizio Analisi Microbiologiche Fondazione IRCCS "S. Matteo", p.le Golgi, 27100 Pavia;

⁴Dip. di Patologia e Medicina Sperimentale e Clinica Azienda Ospedaliero - Universitaria di Udine P.le Santa Maria della Misericordia 15, 33100 Udine.

Introduzione. Le infezioni delle vie urinarie, nosoco-

miali o acquisite in comunità, provocate da batteri ESBL produttori, rappresentano un grave problema clinico e terapeutico; ad oggi, non sono disponibili dati, epidemiologicamente significativi, relativi ai pazienti nelle LTCFs. Obiettivo dello studio è stato valutare la prevalenza di Enterobatteri ESBL produttori in LTCFs distribuite sul territorio nazionale.

Metodi. lo studio è stato condotto nel periodo Settembre 2006-Gennaio 2007. I campioni sono stati raccolti in 37 LTCFs nello stesso giorno da pazienti con catetere urinario. I test di sensibilità sono stati eseguiti con card AST-GN13 (Vitek2 System Bio-Mérieux. La produzione di ESBL è stata valutata mediante test del doppio disco e CLSI (2007).

Risultati. Sono stati raccolti 496 isolati di *Enterobacteriaceae*. Gli uropatogeni di più frequente riscontro sono stati: *E. coli* (40.5%), *P. mirabilis* (17.7%), *P. stuartii* (17.2%), *M. morganii* (9.7%), *K. pneumoniae* (8.5%), *Citrobacter* spp. (3.4%), *Enterobacter* spp. (2.2%) ed altri (0.8%). Le frequenze di *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. stuartii*, *M. morganii*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter* spp. ed *Enterobacter* spp. ESBL produttori sono risultate del 37.3%, 51.1%, 52.9%, 41.7%, 23.8%, 35.3% e 45.5% rispettivamente. In generale gli Enterobatteri ESBL produttori rappresentavano il 41.5%. L'incidenza degli isolati ESBL produttori variava, nelle differenti LTCFs, fra il 9.1% ed il 100%. Il 26.6% degli isolati di *P. mirabilis* ed il 16% degli isolati di *E. coli* ESBL produttori sono risultati, inoltre, cefoxitina-resistenti. Gli isolati erano caratterizzati da co-resistenze e da sensibilità ai carbapenemici.

Conclusioni. la prevalenza degli Enterobatteri ESBL produttori è risultata estremamente elevata, se confrontata con quelle riportate da studi di sorveglianza nazionale in ospedali per acuti. I dati ottenuti sottolineano che le LTCFs possono costituire *reservoirs* di microrganismi antibiotico - resistenti e che le ESBL sono ampiamente diffuse anche in queste strutture; da qui la necessità di adottare tempestivamente misure di controllo e prevenzione.

CO4.3

INFEZIONI EMERGENTI DA CA-MRSA IN ITALIA

Monaco M.¹, D'Ambrosio F.¹, Venditti M.², Parisi G.³, Di Rosa R.², Tinelli M.⁵, Pantosti A.¹.

¹Istituto Superiore di Sanità, Roma;

²Università di Roma "La Sapienza";

³Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini;

⁴Ospedale di Lodi, Lodi.

Introduzione. Negli ultimi anni si è assistito, in varie parti del mondo, all'emergenza di infezioni sostenute da ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente acquisiti in comunità (CA-MRSA). I ceppi CA-MRSA differentemente dai ceppi ospedalieri sono sensibili alla maggior parte degli antibiotici non beta-lattamici e sono caratterizzati dalla presenza di fattori di virulenza specifici tra i quali la tossina Panton-Valentine (PVL).

Metodi. Nel periodo aprile 2005-marzo 2007, 6 ceppi di CA-MRSA acquisiti in comunità sono stati isolati da pazienti con infezioni gravi, tra cui polmonite necrotizzante e sepsi. I ceppi sono stati caratterizzati per il profilo di antibiotico-resistenza mediante metodi automatizzati. La presenza dei geni per la PVL è stata rilevata utilizzando saggi di PCR. Il tipo strutturale dell'elemento *mec* (SCC*mec*) è stato determinato mediante PCR multipla. Il background genetico del ceppo è stato analizzato attraverso PFGE, MLST ed analisi della sequenza della regione dei tandem repeat della proteina A (*spa* type).

Risultati. I ceppi sono risultati resistenti alla meticillina e sensibili a tutti gli antibiotici non beta-lattamici. Tutti i ceppi erano positivi per la presenza della tossina PVL. Di 6 ceppi, 5 contenevano il tipo IV dell'elemento strutturale *mec* ed uno conteneva il tipo V. Mediante MLST i ceppi sono risultati appartenere a tre diversi cloni, tra cui ST30, ST80 ed ST8.

Conclusione. I ceppi CA-MRSA isolati appartengono a quei cloni prevalenti sia in Europa che in Nord America. I casi osservati rappresentano, probabilmente, la punta dell'iceberg, in quanto segnalati da attenti clinici o microbiologi allertati dalla severità del quadro clinico osservato. L'emergenza di ceppi antibiotico-resistenti e particolarmente virulenti, quali i CA-MRSA, potrebbe causare problemi nella scelta della terapia empirica delle infezioni comunitarie.

comunicazioni orali

SESSIONE 5

Infezioni virali latenti, persistenti e croniche

Giovedì 4 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, SALA BLU

CO5.1

HCV-RNA IN LINFOCITI (PBMC) DEL SANGUE PERIFERICO: PRESENZA DI HCV OCCULTA NELLA POPOLAZIONE GENERALE

De Marco L., Gillio Tos A., Fiano V., Merletti F.

*Laboratorio di Epidemiologia Molecolare, CeRMS, SCDU
Epidemiologia dei Tumori, ASO S. G. Battista Torino*

Introduzione. Studi recenti (Castillo, 2004) hanno descritto una tipologia di infezione, definita "HCV occulta", in pazienti con patologia epatica cronica ad eziologia sconosciuta.

Tale infezione è stata riscontrata in pazienti con valori epatici anormali e assenza sia di anticorpi che di HCV-RNA sierico. Sottoposti ad esame biotico del fegato, questi pazienti presentavano epatociti positivi per HCV-RNA. La ricerca di HCV-RNA nei PBMC può essere un'indagine utile per evidenziare pazienti con infezione occulta quando la biopsia epatica non sia disponibile.

Ad oggi la letteratura descrive questo scenario esclusivamente in relazione alle patologie epatiche e non si conosce, al momento, la prevalenza di HCV-RNA nei linfociti della popolazione generale con sierologia negativa.

Scopo di questo lavoro è di valutare la prevalenza di HCV occulta nella popolazione generale.

Materiali e Metodi. La presenza di HCV-RNA è stata ricercata nel buffy-coat di 100 soggetti sani (50 uomini, 50 donne, età 40-65 anni) reclutati nell'ambito di studi epidemiologici in corso. Ig-G anti HCV sono state valutate in tutti i soggetti. In caso di positività di RNA-HCV nel buffy-coat e negatività sierologica, è stato ricercato RNA-HCV plasmatico per confermare lo stato di HCV occulta.

Risultati. Tutti i campioni analizzati sono risultati

essere sierologicamente negativi per HCV. Due su 100 buffy-coat sono stati ritrovati positivi per HCV-RNA, mentre l'analisi sul plasma è risultata in tutti negativa. Stiamo replicando lo studio su altri 180 soggetti. I risultati preliminari confermano le prevalenze dello studio sopra descritto.

Conclusioni. L'identificazione di HCV-RNA nei linfociti di soggetti risultati negativi per HCV agli screening routinari potrebbe fornire una maggiore tutela in occasione di eventuali trasfusioni e/o leucaferesi.

CO5.2

MIGLIORAMENTI NELLA DETERMINAZIONE DEI GENOTIPI HCV MEDIANTE L'UTILIZZO DEL VERSANT HCV GENOTYPE 2.0 (INNO-LIPA HCV 2.0)

Sabatini R., Sias C., Garbuglia A.R., Capobianchi M.R.

*Laboratorio di Virologia, INMI L. Spallanzani,
Viale Portuense 292, 00149 Roma*

Introduzione. La regione non codificante (NC) all'estremità 5' dell'HCV RNA è comunemente utilizzata per identificare i sei maggiori genotipi di HCV ed i principali sottotipi. Tuttavia il kit commerciale più diffuso, basato su ibridazione inversa (INNO-LIPA HCV1.0), spesso non è in grado di distinguere i sottotipi 1a, 1b, 2a, 2c e di identificare genotipi rari come il 6. Recentemente si è resa disponibile una nuova versione, INNO-LiPA HCV2.0, in cui oltre alla regione 5'NC viene considerata anche la regione *core*.

Abbiamo valutato i miglioramenti apportati dal nuovo kit, con particolare riferimento alla sottotipizzazione dei genotipi 1, 2 e alla identificazione di genotipi rari.

Metodi. Con il nuovo kit sono stati riesaminati 41

campioni precedentemente analizzati con la precedente versione (20 di genotipo 1 non sottotipizzati, 20 di genotipo 2a/2c, ed uno non tipizzabile, risultato di genotipo 6 con l'analisi di sequenza).

Risultati. In tutti i 20 campioni di genotipo 1 è stata possibile la sottotipizzazione con la versione 2.0: 19 (95%) sono risultati 1a, 1 campione è risultato 1b (5%); tutti i 20 campioni 2a/2c rimanevano non sottotipizzabili anche con la versione 2.0. Il campione di genotipo 6 veniva correttamente classificato con la versione 2.0.

Conclusioni. I risultati dimostrano che, per quanto concerne il genotipo 1, l'introduzione di sonde per la regione *core* rappresenta un avanzamento per la differenziazione tra genotipo 1a ed 1b, mentre l'impossibilità di discriminare tra il genotipo 2a e 2c ci lascia presumere che sia la regione 5'NC che la regione *core* non siano sufficientemente eterogenee per la differenziazione tra questi sottotipi. Degna di nota si è rivelata la possibilità di identificare mediante la versione 2.0 genotipi rari come il 6.

CO5.3

RICERCA DI IGG E IGM ANTI-PARVOVIRUS B19 E DEL DNA VIRALE: ESPERIENZA DI 6 ANNI PRESSO U.O. DI VIROLOGIA A PARMA

Medici M.C., Pinardi F., Esteban M.D.P., Martinelli M., Dettori C., Chezzi C.

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

Introduzione. La diagnosi di laboratorio dell'infezione da Parvovirus B19 (B19) può essere condotta attraverso la rivelazione nel siero/plasma delle IgG e IgM specifiche e/o del DNA virale.

Scopo dello studio è stato quello di analizzare i risultati ottenuti presso l'u.o. di Virologia dell'Azienda ospedaliero-universitaria di Parma dalle indagini condotte per la ricerca di IgG e IgM anti-B19 e quelle per la ricerca del DNA virale su soggetti ricoverati od osservati ambulatorialmente negli ultimi 6 anni.

Metodi. La ricerca delle IgG e IgM anti-B19 è stata condotta mediante saggio immunoenzimatico (Parvovirus B19 EIA, Biotrin International) e quella del DNA virale mediante nested PCR (Parvovirus B19 oligomix, Nanogen Advanced Diagnostics s.r.l.).

Risultati. Da gennaio 2002 a dicembre 2006 sono stati sottoposti a diagnosi di laboratorio di infezione da B19 941 soggetti. Di questi, 403 sono stati sottoposti alla sola ricerca di IgG e IgM sieriche specifiche, 414 alla sola ricerca del DNA virale e 124 ad entrambe le ricerche. Dei 527 soggetti complessivamente sottoposti alla ricerca anticorpale, il 38,1% (201 soggetti) è risultato IgG e IgM negative, il 57,5% (303 soggetti) IgG positive e IgM negative, il 3,8% (20 soggetti) IgG e IgM positive e lo 0,6% (3 soggetti) IgG negative IgM positive. Il DNA virale ricercato in 13 dei 23 soggetti IgM positivi è stato rivelato nell'84,6% (11 soggetti). Dei rimanenti 525 soggetti sottoposti complessivamente all'indagine molecolare, il DNA virale è stato rivelato nel 2,3% (12 soggetti, non esaminati per IgG e IgM).

Conclusioni. La prevalenza di infezione da B19 valutata attraverso l'indagine sierologica in soggetti ricoverati e ambulatoriali nell'area di Parma è risultata almeno del 61,3% (323 su 527). Il ritrovamento di IgM specifiche sembra consentire una diagnosi di infezione acuta almeno nell'84,6% dei casi. L'indagine molecolare si rende utile sia per confermare un'eventuale diagnosi sierologica di infezione acuta sia in alcune circostanze per accertare uno stato viremico direttamente come pure in seguito al ritrovamento di IgM.

comunicazioni orali

SESSIONE 6

Technology assessment in microbiologia

Giovedì 4 ottobre 2007, ore 09.00 - 11.00, SALA BIANCA

CO6.1

QUANTIFERON®-TB GOLD: TECHNOLOGY ASSESSMENT PER LA SORVEGLIANZA NEGLI OPERATORI SANITARI

Caola I.¹, Caciagli P.², Guarrera G.M.³, Casna G.⁴

¹Laboratorio di Microbiologia e Virologia

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio

³Direzione Cura e Riabilitazione, APSS Trento

⁴Scuola Superiore di Formazione Sanitaria, Rovereto

È stata valutata l'introduzione nell'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari di Trento (APSS) del test QuantiFERON® - TB Gold (QFT-G), in sostituzione dell'intradermo-reazione di Mantoux, finalizzata alla sorveglianza della tubercolosi latente (LTBI) negli operatori sanitari. La gestione della sorveglianza negli esposti al rischio di infezione tubercolare presenta aspetti problematici con la diagnostica tradizionale: bassa specificità del test tubercolinico (TST) per cross-reattività verso micobatteri ambientali e BCG utilizzato per la vaccinazione, effetto "booster," elevata variabilità e scarsa standardizzazione interoperatore nell'esecuzione e valutazione del test, necessità di una doppia presentazione dell'operatore. Il nuovo test misura la quantità di interferone gamma (IFN- γ) prodotto e rilasciato in vitro dai linfociti T stimolati da antigeni di *M. tuberculosis*. È caratterizzato da un unico prelievo di sangue: ciò facilita la compliance degli operatori ai programmi di prevenzione coordinati dal Nucleo del Medico Competente. Numerosi studi hanno dimostrato che la diagnosi di LTBI formulata attraverso l'uso di test in vitro è più sensibile e più specifica rispetto all'approccio tradizionale. Nel 2005 il medico competente dell'APSS ha proposto al CIO di Trento l'introduzione del QFT-G per 900 operatori

(neoassunti, tirocinanti, studenti scuole sanitarie, operatori dopo esposizione a pazienti bacilliferi, a rischio infettivo TBC, con Mantoux non nota o > 5 anni). Dopo pubblicazione delle linee guida del CDC sull'utilizzo del test, il CIO ha richiesto la prestazione al Laboratorio di Microbiologia che ha condotto la valutazione secondo metodologia HTA, analizzando le ricadute organizzative sul servizio ed i costi. La metodica di esecuzione di dosaggio dell'IFN- γ è automatizzabile su strumentazione già in uso; i trasporti e la consegna dei campioni all'unico laboratorio dipartimentale di esecuzione richiedono una attenta pianificazione (intervallo massimo di tempo tra prelievo e inizio del trattamento 16 ore). L'analisi economica ha messo in evidenza come il costo totale del test TST sia maggiore di quello del QFT-G, perché gravato dal costo della mancata prestazione per l'assenza dal posto di lavoro dell'operatore. La valutazione effettuata ha fornito elementi utili per indirizzare il decisore all'introduzione della stessa quale nuova prestazione di laboratorio.

CO6.2

UTILIZZO DI RT-PCR COME METODO DI SCREENING PER STREPTOCOCCO DI GRUPPO B IN DONNE GRAVIDE.

Cavrini F.¹, Serra L.², Liguori G.¹, Pierro A.¹, Lanari M.², Sambri V.¹

¹DMCSS, Divisione di Microbiologia, Università di Bologna e

²U.O. di Pediatria e Neonatologia, Ospedale S.Maria della Scaletta, Imola (Bologna).

Introduzione. Il tratto gastrointestinale costituisce il "serbatoio" dello streptococco beta-emolitico di gruppo B (SGB) e quindi la fonte della colonizzazione

materna vaginale intrapartum, fattore determinante per l'insorgenza di infezione neonatale "precoce", (Early onset group B Streptococcus disease EOGBSD). Nelle linee guida dei CDC 2002 si raccomanda l'esecuzione dello screening colturale a 35-37 settimane di E.G. per ottenere la migliore correlazione con la colonizzazione al momento del parto e identificare le madri da sottoporre a profilassi antibiotica intrapartum (IAP) al fine di ridurre l'incidenza di EOGBSD. Lo scopo dello studio è stato valutare la corrispondenza tra la colonizzazione materna rilevata a 35-37 settimane di E.G. mediante coltura su tampone vagino-rettale e quella intrapartum rilevata mediante coltura sul tampone vaginale intrapartum (TVI) e Real Time PCR.

Metodi. Nel periodo da giugno 2006 ad aprile 2007, in 117 gravide risultate positive allo screening a 35-37 settimane di E.G. con tampone vagino-rettale, e in 251 risultate negative (368 gravide in totale) è stato raccolto un TVI. Precedentemente all' incubazione di 24 ore nel terreno di arricchimento selettivo Todd-Hewitt, un' aliquota del campione è stata processata per Real Time PCR.

Risultati. Per il 23% delle gravide colonizzate a 35-37 settimane di E.G. è stata confermata la positività per SGB nella coltura intrapartum (CI) mentre la PCR ha evidenziato la positività intrapartum per SGB nel 53%. Analizzando il 30% di discordanza tra PCR e coltura intrapartum in questo gruppo di pazienti positive si è osservato che metà (15%) era dovuto a esecuzione del tampone intrapartum dopo somministrazione di terapia antibiotica rendendo impossibile l'isolamento colturale ma possibile l'identificazione dell'acido nucleico. Nel 7,5% delle donne gravide negative a 35-37 SGB è stato identificato mediante PCR, mentre nel 2,3% è stato isolato in coltura. Valutando la concordanza tra le due metodiche intrapartum, PCR e coltura solo un campione positivo in coltura è risultato negativo in PCR (concordanza positiva del 97%) mentre la concordanza negativa è del 85%.

Conclusioni. La PCR ha dimostrato ottima concordanza con la coltura intrapartum e una concordanza con lo screening alla 35-37 settimana del 53% nel gruppo di donne colonizzate e del 92,3% nel secondo gruppo. La discordanza riscontrata tra la positività della coltura a 35-37 settimane e la positività intrapartum può essere in parte riferita alla maggior sensibilità del tampone vagino-rettale rispetto al vaginale e in parte a una variazione nello stato di colonizzazione della donna gravida.

CO6.3

USO DELLA TECNICA rep-PCR PER LA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI MICOBATTERI APPARTENENTI AL MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX

Manfredini C.¹, Russo C.¹, Bellocchi M.C.¹, Tortoli E.², Menichella D.¹

¹U.O. di Microbiologia Dipartimento dei Laboratori, Ospedale Bambino Gesù, Roma

²Centro Regionale di Riferimento per i Micobatteri, Ospedale Careggi, Firenze

Introduzione. I micobatteri non tubercolari (MOTT) sono germi ubiquitari, patogeni opportunisti, responsabili di infezioni localizzate o disseminate specialmente nel soggetto immunocompromesso. Nei pazienti pediatrici, le specie appartenenti al *Mycobacterium avium* complex (MAC) rappresentano una delle cause più frequenti di infezioni da MOTT, anche in assenza di immunocompromissione. Il MAC rappresenta un gruppo eterogeneo di organismi, al cui interno si distinguono due specie principali (*M. avium* e *M. intracellulare*) e un gruppo di micobatteri correlati denominati *M. non-avium-non-intracellulare*. Recentemente è stata sviluppata una piattaforma integrata, standardizzata e semi-automatica, basata sul principio della repetitive-sequence PCR (rep-PCR). Nel nostro studio abbiamo valutato la capacità discriminante della tecnica di rep-PCR su ceppi appartenenti al MAC al fine di definire la possibilità di utilizzare tale sistema come strumento molecolare rapido di tipizzazione e fingerprinting.

Metodi. 89 isolati da colture di micobatteri, sono stati identificati mediante sequenziamento genomico del gene 16S rDNA (500bp). 29 *M. avium*, 60 *M. intracellulare* e *M. non-avium-non-intracellulare* sono stati tipizzati mediante rep-PCR utilizzando una piattaforma integrata con rilevazione su "chip" ed elaborazione statistica informatizzata dei frammenti amplificati (DiversiLab System)

Risultati. Il sistema automatico rep-PCR è stato in grado di differenziare all'interno del MAC.

In particolare: tra gli isolati di *M. avium* è stato rilevato un alto grado di similarità (>95%), mentre tra gli isolati di *M. intracellulare* e *M. non-avium-non-intracellulare* la similarità scende al 70% benché siano evidenziabili alcuni sotto-clusters ad elevata omologia.

Conclusioni. La tecnica di rep-PCR ha confermato l'identificazione genotipica. La tipizzazione a livello di ceppo ha mostrato un alto grado di omologia per le specie di *M. avium* in studio. Di contro è stato dimostrato un alto potenziale discriminativo per gli isolati di *M. intracellulare* e *M. non-avium-non-intracellulare*.

Nella nostra esperienza la tecnologia automatica di rep-PCR risulta essere uno strumento rapido ed efficace per l'identificazione genotipica degli isolati di MAC e per studi di fingerprinting applicati al tracing epidemiologico.

comunicazioni orali

SESSIONE 8

Infezioni da Biofilm Microbici: antibiotico-resistenza, virulenza, diagnostica e approcci farmacologici

Venerdì 5 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

CO8.1

FORMAZIONE DI BIOFILM IN VITRO DA PARTE DI CEPPI DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS SENSIBILI E RESISTENTI ALLA METICILLINA ISOLATI DA PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Lambiase A., Del Pezzo M., *Raia V., Pulcrano G., Roscetto E., Rossano F.

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano".

*Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica.

Dipartimento di Pediatria. Università di Napoli "Federico II".

L'eziologia dell' infezione polmonare in Fibrosi Cistica (CF) è ascrivibile a diversi patogeni batterici che possono essere abili a formare biofilm in tale sede, abilità conferente vantaggi quali protezione dalla risposta immunitaria ed antibiotico-resistenza.

Scopo dello studio è analizzare la capacità di produzione di biofilm da parte di ceppi di *Staphylococcus aureus* sia sensibili che resistenti alla meticillina (MSSA e MRSA) isolati da campioni respiratori di pazienti CF. A tal fine sono stati utilizzati ceppi di MSSA (n=30) e ceppi di MRSA (n=30) isolati da pazienti in follow-up presso il Centro di Riferimento per la CF Campano, nel periodo 2003-2006.

Per valutare l'aderenza batterica, abbiamo utilizzato un **metodo** spettrofotometrico per cui inoculi batterici cresciuti in TSB sono poi diluiti con TSB fresco e con TSB privo di glucosio. Aliquote di tali inoculi sono poste in micropiastre ed incubate per 18 h a 37°C. Dopo un lavaggio con PBS, i pozzetti sono colorati con cristal violetto e l'aderenza alle superfici è letta allo spettrofotometro (570 nm). Il valore di aderenza risulta calcolato secondo la formula: $\sqrt{(\text{OD in TSB})^2 + (\text{OD in TSB senza glucosio})^2}$. I cut-off utilizzati sono: $\text{OD} \leq 0.120 \rightarrow$ batteri

non aderenti; $\text{OD} > 0.240 \rightarrow$ batteri fortemente aderenti; $\text{OD} > 0.120 - 0.240 \rightarrow$ batteri debolmente aderenti (Christensen et al 1985; 22: 996-1006).

I **risultati** indicano che ceppi MRSA sono significativamente più aderenti rispetto a ceppi MSSA se coltivati in TSB privo di glucosio ($p=0.01$), mentre, se coltivati in mezzo con glucosio, sia i ceppi MRSA che quelli MSSA risultano avere la stessa capacità ad aderire.

Le **conclusioni** di tali dati sembrano correlare la resistenza alla meticillina ed l'abilità ad aderire alle superfici ed evidenziano il ruolo dell'influenza ambientale su tale abilità. Lo studio quantitativo della produzione di biofilm rappresenta uno strumento di conoscenza necessario per caratterizzare ulteriormente i ceppi responsabili di infezioni polmonari in pazienti CF.

CO8.2

CARATTERIZZAZIONE DI UN CEPPO DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA PROTESI VASCOLARE

Petrelli D¹; Repetto A²; Ciurnella E.²; Parente B.³; Tavolini V.³; Cao P.³; Ripa C.; Vitali L.A.¹

¹Dip. Biologia MCA - Università di Camerino (Camerino)

²Struttura Complessa di Microbiologia

- Ospedale S. Maria della Misericordia (PG)

³Struttura Complessa di Chirurgia Vascolare e

Endovascolare - Università degli Studi di Perugia (PG)

Introduzione. La formazione di biofilm complica il quadro delle infezioni associate a dispositivi medici impiantabili dovute allo *S. aureus*. Il biofilm rappresenta un fattore di virulenza e ha un notevole impatto sulla patogenesi e la terapia. La rimozione del dispositivo infetto risulta spesso indispensabile aumentando sia il trauma per il paziente che il costo del trattamento. Questo lavoro riporta lo studio delle caratteristiche

fenotipiche e genotipiche di uno *S. aureus* da protesi vascolare alto produttore di biofilm.

Metodi. Il ceppo di *S. aureus* è stato isolato da bypass cross over femoro-femorale dx-sx, rimosso da un paziente ricoverato con segni di infezione associati alla protesi vascolare. È stato eseguito l'antibiogramma per PEN, OXA, ERY, TET, CLI, TEL, GEN, CIP, Q-D, RIF, LZD e VAN. La ricerca dei geni di resistenza e di adesività è stata eseguita mediante PCR. Per la quantizzazione del biofilm è stato applicato il saggio del cristalvioletto (CV) mentre il grado di idrofobicità è stato misurato mediante test di adesione agli idrocarburi (toluene).

Risultati. La crescita del ceppo su piastra dava luogo a colonie mucoidi con consistenza elastico-filamentosa, cui corrispondeva, in liquido, la formazione di ammassi ("clump") fortemente resistenti alla disaggregazione. Il ceppo era resistente alla PEN e all'ERY e positivo ai geni *blaZ* e *ermA*.

La quantizzazione della biomassa nel saggio al CV ha dato elevati valori di O.D.₅₄₀ (3.0-6.0). Il biofilm, al microscopio confocale, si presentava particolarmente poroso e spesso. L'aggiunta dell'NaCl o dell'etanolo aumentava la quantità di biofilm mentre quella di glucosio la faceva diminuire. Il ceppo era altamente idrofilico e la sua capacità di autoaggregazione sensibile al sodio-metaperiodato. L'analisi dei determinanti genetici di adesività ha fornito il seguente genotipo: *ica⁺atl⁺pls⁺fbaA⁺clfA⁺clfB⁺cna-spa+bbp+sdrC+sdrD⁻sdrE⁺epbS⁻map/eap⁺sasG⁺bap⁻*.

Conclusioni. La presenza di ceppi di *S. aureus* con particolari proprietà nella capacità di formare biofilm sono un problema serio nella pratica chirurgica che utilizza dispositivi protesici.

comunicazioni orali

SESSIONE 9

Aggiornamento in tema di diagnosi e gestione delle sepsi

Venerdì 5 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, SALA BIANCA

CO9.1

LA BIOLOGIA MOLECOLARE (SEPTIFAST) APPLICATA ALLA DIAGNOSTICA DELLE SEPSI: NOSTRE ESPERIENZE PRELIMINARI

Dodaro S., Cavalcanti P., Filia M.A., Gallo M., Nudo L., Casazzone B., Gaccione C., Pingitore P., Noto A., Giraldi C.

Microbiologia e Virologia, Ospedale Annunziata, AO Cosenza

Introduzione. L'aumentata incidenza di sepsi in soggetti immunocompromessi ha reso indispensabile l'uso di metodi affidabili e rapidi finalizzati alla identificazione dell'agente etiologico. In tale contesto l'impiego di un test di amplificazione genica rivolto ai microrganismi più frequentemente responsabili può risultare di ausilio nella riduzione dei tempi di refertazione.

Metodi. Sono stati sottoposti ad indagine due gruppi di pazienti, il primo con forte sospetto clinico di sepsi non ancora accertata, il secondo con sepsi confermata da emocoltura positiva.

Su entrambi i gruppi sono stati eseguiti contemporaneamente due prelievi ematici, uno destinato all'esame colturale con metodo tradizionale con il sistema BACTEC 9240 (Becton Dickinson) e l'altro destinato al test di amplificazione genica mediante LightCycler SeptiFast Test (Roche).

Nel primo gruppo di pazienti i prelievi sono stati eseguiti prima dell'inizio della terapia antimicrobica, mentre nel secondo gruppo dopo 3-5 giorni dall'inizio della terapia.

Risultati. Nella maggioranza dei casi appartenenti al primo gruppo di pazienti abbiamo ottenuto una concordanza tra i due metodi.

I risultati relativi al secondo gruppo di pazienti evidenziano invece maggiore sensibilità del metodo di ampli-

ficazione rispetto a quello colturale.

Conclusioni. Premesso che i risultati da noi esposti sono relativi ad un numero modesto di casi esaminati, è possibile tuttavia formulare alcune considerazioni:

- Il test si è rivelato, nelle nostre mani, molto rapido nella sua esecuzione e lettura dei risultati, permettendo di ottenere una identificazione in 6-8 ore. Tale lasso di tempo è stato inoltre sufficiente alla determinazione dei ceppi MRSA e VRE.
- Il test ci ha consentito la identificazione di ceppi responsabili di sepsi anche una volta iniziata la terapia antimicrobica a fronte di emocolture ormai negative.
- Esiste, tuttavia, la possibilità di riscontro, con il metodo colturale, di microrganismi che, se pur poco frequentemente causa di sepsi, non sono inclusi nelle "specie bersaglio" riconosciute con il LightCycler SeptiFast Test.

CO9.2

IL DOSAGGIO DELLA PROCALCITONINA NELLA DISTINZIONE TRA SEPSI E SIRS NEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA

Grondona A.G., Deleonardi G., Procaccio L., Marchetti D., Antonelli S., Squintani L., Calanca F., Gaspari G.

Laboratorio Azienda USL di Bologna,
Ospedale Maggiore, L.go Nigrisoli, 2 - 40133, Bologna

Introduzione. La procalcitonina (PCT) è una glicoproteina di 116 amminoacidi con PM di 16 kD. Viene indotta da numerosi stimoli tra cui endotossine batteriche, citochine proinfiammatorie ed eventi come traumi o shock. I livelli rimangono bassi quando un'infezione non porta ad una risposta infiammatoria sistemica. La PCT è utile nel monitoraggio del decorso della sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS). Il suo andamento riflette la cronologia della reazione infiammatoria ed è correlato alla gravità dell'infezione.

Metodi. Nel nostro Laboratorio abbiamo testato PCT su 46 pazienti ricoverati in Terapia Intensiva, Terapia Intensiva Neonatale e Pediatria. Per 20 pazienti esisteva un forte sospetto di sepsi con possibile SIRS; in 12 pazienti erano presenti segni e sintomi di infezione d'organo (polmonite, colecistite, iperpiressia di ndd). I rimanenti 14 pazienti erano soggetti con patologie non riferibili ad infezione pur presentando leucocitosi e febbre. I campioni sono stati processati con il test PCT BRAHMS PCT-Q (Dasit), metodo rapido semiquantitativo in immunocromatografia, e con il metodo quantitativo Liaison Brahms PCT (DiaSorin), con tecnologia di rilevazione in chemiluminescenza, con espressione dei risultati in ng/ml. Ai pazienti con forte sospetto di sepsi generalizzata sono state effettuate emocolture o colture di materiali provenienti dagli organi interessati ai processi infettivi.

Risultati. I risultati hanno dimostrato una sostanziale concordanza del test con altri parametri di infezione quali coltura, leucocitosi. Nei soggetti di controllo non si sono avuti valori di PCT superiori alla norma, dimostrando il test una buona specificità.

Valori elevati di PCT hanno permesso un inizio immediato della terapia antibiotica con migliore *outcome* per il paziente.

Conclusioni. La SIRS è considerata infezione ad alto grado di letalità; un test come il dosaggio della PCT permette al clinico di usufruire di un importante marcatore di sepsi e al microbiologo di disporre di una metodica che permetta un orientamento nelle indagini microbiologiche.

CO9.3

PCR REAL-TIME COME STRUMENTO PER MIGLIORARE LA DIAGNOSI EZIOLOGICA DI SEPSI NEONATALE

Paolucci M.¹, Dal Monte P.¹, Capretti M.G.², Faldella G.², Sambri V.¹

¹DMCSS, sezione di Microbiologia.

²Istituto Clinico di Pediatria Preventiva e Neonatologia, UO Neonatologia.

Policlinico S.Orsola-Malpighi,

Università degli Studi di Bologna.

Introduzione. La diagnosi e il trattamento adeguato della sepsi sono importanti nella popolazione neonatale, ma spesso la scarsa sensibilità dell'emocoltura rende difficile l'identificazione del patogeno e il ritardo nella diagnosi non permette il trattamento mirato dell'infezione sistemica.

Questo studio ha lo scopo di valutare l'utilità del nuovo test LightCycler® SeptiFast, Roche Diagnostics che è in grado di rivelare in real-time PCR la presenza di DNA dei 25 patogeni maggiormente responsabili di sepsi.

Materiali e Metodi. 42 campioni di sangue periferico sono stati prelevati da 35 neonati (età gestazionale: 24-41 settimane; peso alla nascita: 518-4260 g; età al momento del prelievo: 1-50 giorni di vita) e sono stati valutati per emocromo completo, Proteina C reattiva, Emocoltura e PCR real-time.

Risultati. 34 campioni di sangue sono stati ottenuti da pazienti con sospetta sepsi e 8 da neonati sani (controllo negativo). Tra tutti gli episodi di sospetta sepsi, 7 casi (21%) sono stati confermati dall'emocoltura e/o SeptiFast. In particolare in 3 pazienti entrambe le tecniche hanno identificato la presenza di *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *CoNS* (*Coagulase negative Staphylococcus*) o del loro DNA, mentre in 4 campioni solo la PCR ha identificato l'infezione sistemica causata da *Klebsiella pneumoniae-oxytoca*, *Streptococcus pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Streptococcus* spp. Inoltre, in due campioni tra i 7 episodi settici confermati, SeptiFast ha rivelato la coinfezione da parte di due patogeni. La crescita di *Staphylococcus epidermidis* nell'emocoltura di un paziente è stata identificata come contaminazione da CoNS dal SeptiFast.

Nei restanti 26 casi di sospetta sepsi (76%) entrambe le tecniche hanno mostrato un risultato negativo.

Tutti i campioni di pazienti sani sono risultati negativi ad entrambe le tecniche.

Conclusioni. SeptiFast può essere un utile strumento per la diagnosi microbiologica di sepsi in neonati e per la rapida refertazione di campioni negativi sui quali è possibile accertare altre eziologie. Inoltre, permette di evitare l'uso improprio di antimicrobici su pazienti non settici, in modo da ridurre il rischio di antibiotico-resistenza e da contenere la spesa sanitaria.

comunicazioni orali

SESSIONE 10

Aspetti diagnostici, epidemiologici e di sorveglianza di infezioni batteriche di origine ambientale

Venerdì 5 ottobre 2007, ore 08.30 - 10.15, SALA BLU

CO10.1

RHIZOBIUM RADIOBACTER, UN MICRORGANISMO AMBIENTALE CON CARATTERISTICHE DI PATOGENO OPPORTUNISTA

Francone M.; Gangemi F.; Martino N.; Bolignano G.; Barbaro P.

Unità Operativa di Microbiologia
Azienda Ospedaliera "Bianchi - Melacrino - Morelli"
Via Melacrino, 89133 Reggio Calabria

Introduzione. *Rhizobium radiobacter*, precedentemente denominato *Agrobacterium radiobacter*, è un batterio aerobio Gram negativo ubiquitario, ed è principalmente conosciuto come patogeno delle piante. Nell'uomo è stato associato a malattie sistemiche, peritoniti, infezioni delle vie urinarie, miositi.

Materiali e metodi. Nella nostra Unità Operativa di Microbiologia, nell'ultimo anno (aprile 2006 - aprile 2007), sono stati isolati ed identificati con card Vitek 2 GN (Bio Merieux), 5 ceppi di *Rhizobium radiobacter* tutti da emocolture di pazienti debilitati e/o immunocompromessi, provenienti da reparti diversi.

In letteratura, la risposta al test di sensibilità agli antibiotici viene riportata variabile, mentre per quanto riguarda la nostra esperienza, i ceppi isolati sono risultati sensibili alla maggior parte delle classi di antibiotici saggiati, per cui molecole come ciprofloxacina, piperacillina-tazobactam, trimethoprim-sulfametossazolo, ceftazidime, imipenem, gentamicina ed amikacina, potrebbero essere delle valide scelte terapeutiche.

Conclusioni. Questo lavoro vuole porsi come un contributo epidemiologico sulla diffusione di questo microrganismo, ed altresì un ulteriore riscontro a ciò che la letteratura internazionale sta segnalando nell'ultimo decennio, cioè un aumento del numero di

infezioni dovute a questo microrganismo, soprattutto batteriemie associate alla presenza di cateteri vascolari.

CO10.2

LEGIONELLOSI: MICROBIOLOGIA, LINEE GUIDA E SORVEGLIANZA NELLA REGIONE MOLISE

Sferra D., Pellegrino G., Di Pardo L., Melloni A., Barone E; Piccirilli M., Giancola M., Caruso G., Manuppella A.

Arpa Molise Dipartimento Provinciale di Isernia

Introduzione. La legionellosi è una patologia grave e a letalità elevata, acquisita per via respiratoria principalmente mediante inalazione di aerosol contaminati provenienti da sistemi idrici. Le Legionelle sono ubiquitarie negli ambienti acquatici naturali, dai quali si trasferiscono a quelli artificiali, che fungono da amplificatori dei microrganismi.

Il Laboratorio Regionale di Riferimento molisano per la sorveglianza della Legionellosi, istituito presso il Dipartimento di Isernia dell'ARPA Molise, effettua il monitoraggio di strutture che ospitano soggetti a rischio (Ospedali, Case di Riposo, Case Circondariali) e di strutture coinvolte in episodi di malattia; la ricerca di *Legionella* spp. viene effettuata nelle reti di distribuzione dell'acqua calda e fredda, nell'acqua delle torri di raffreddamento nonché, per gli ospedali, nell'acqua contenuta nelle apparecchiature per la respirazione assistita.

Metodi. Sono stati analizzati 584 campioni utilizzando il Metodo Unichim n.1037/2002: filtrazione su membrana di un'aliquota nota, risospensione del materiale concentrato in 10 ml di acqua dello stesso campione, semina su terreno MWY e incubazione a

37°C per 10 gg., verifica dello sviluppo in terreno con e senza cisteina e conferma attraverso la tecnica della microagglutinazione al lattice.

Risultati. Nelle strutture controllate è stata riscontrata una contaminazione diffusa che ha riguardato principalmente alberghi ed ospedali; sono state identificate *L. pneumophila* sierogruppi 1, 2-14 e species, con una prevalenza della prima e della seconda nel 70% delle strutture controllate (range cariche: 100 - > 100.000 UFC/L). Per il 50% circa delle strutture sono stati effettuati trattamenti di bonifica, che hanno determinato una significativa riduzione delle cariche microbiche.

Conclusioni. Lo studio ha messo in evidenza come concentrazioni importanti di *Legionella* siano frequenti in strutture dotate di grossi serbatoi di accumulo e assenti in quelle dotate di sistemi istantanei di riscaldamento; inoltre, è stato verificato che una temperatura massima di esercizio > 53°C è correlata con una scarsa carica di *Legionelle*.

CO10.3

FOCOLAIO DI SEPSI DA *Burkholderia cepacia* IN UNITÀ DI TERAPIA INTENSIVA

Puccio R.¹, Matera G.¹, Lo Russo T.¹, Laratta E.¹, Favaro M.², Favalli C.², Liberto M.C.¹, Focà A.¹

¹Cattedra di Microbiologia, Università "Magna Graecia", Via T. Campanella 115, 88100 Catanzaro.

²Laboratori di Microbiologia Clinica, Policlinico "Tor Vergata", V.le Oxford 81, 00133 Roma.

Nell'ambito dello studio sugli outbreaks di sepsi in Unità di Terapia Intensiva (UTI), è pervenuta alla nostra osservazione una serie di campioni di emocoltura positivi per *Burkholderia cepacia*. *Burkholderia* è un genere di batteri gram-negativi che comprende almeno nove distinti genomovars, che usualmente sono riferiti come *Burkholderia cepacia complex*. Una caratteristica peculiare di tali batteri è la possibilità di sviluppare epidemie intraospedaliere.

Lo scopo del presente studio consiste nella verifica della clonalità di 15 ceppi di *Burkholderia cepacia* da noi isolati nel periodo 14 marzo 2007 - 5 aprile 2007 dall'UTI; la caratterizzazione fenotipica è stata eseguita con un sistema convenzionale (VITEK 2, Bio-Merieux, Italia), mentre la tipizzazione molecolare è stata condotta utilizzando una metodica "repetitive sequence-based PCR" (rep-PCR) DiversiLab (Strain typing, bio-Merieux, Italia), specifica per organismi del genere *Burkholderia*. Le tecniche d'isolamento tradizionale da campioni seriali di emocoltura hanno consentito di identificare i 15 ceppi come appartenenti a *Burkholderia cepacia complex*. I risultati della genotipizzazione mediante DNA fingerprinting dopo rep-PCR, sono stati espressi sotto forma di dendrogrammi e d'immagini di gel virtuali, ovvero come scatterplot. I 15 ceppi studiati presentavano profili di DNA fingerprinting sovrapponibili al 98%. Si può concludere che tutti gli isolati esaminati appartenevano allo stesso clone, sebbene non sono note a tutt'oggi le origini di tale limitata epidemia intraospedaliere.