

poster

2 - 5 - Ottobre 2007

<i>da 001 a 066</i>	BATTERIOLOGIA
<i>da 067 a 071</i>	MICOLOGIA
<i>da 072 a 083</i>	PARASSITOLOGIA
<i>da 084 a 127b</i>	VIROLOGIA
<i>da 128 a 157</i>	BIOLOGIA MOLECOLARE
<i>da 158 a 178</i>	INFEZIONI OSPEDALIERE
<i>da 179 a 185</i>	TECHNOLOGY ASSESSMENT

001

RILEVAMENTO DI ENTEROBATTERI PRODUTTORI DI BETA-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO (ESBL) MEDIANTE L'UTILIZZAZIONE DI TERRENI CROMOGENICI: RISULTATI PRELIMINARI IN UN CONFRONTO CON METODI AUTOMATICI E TRADIZIONALI

Crespi I., Kroumova V., Caroppo S., Fanello MR., Mantovani M., Ruzza P., Molinari GL., Andreoni S..

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

La circolazione e diffusione di microrganismi gram-negativi multiresistenti sono un'importante causa di infezioni nosocomiali, in particolare in U.O di Terapia Intensiva e di Lungodegenza. Segnalati per la prima volta all'inizio degli anni 80, gli enterobatteri produttori di beta lattamasi a spettro esteso (ESBL), sono andati aumentando in maniera esponenziale in questi ultimi decenni, rappresentando uno dei principali problemi di gestione profilattico-terapeutica in ambito nosocomiale. A tale proposito, la necessità di utilizzare metodologie affidabili in grado di individuare in tempi brevi, contemporaneamente alla crescita batterica, microrganismi produttori di ESBL, rappresenta una delle priorità di un Laboratorio di microbiologia.

Nell'ambito dello sviluppo dei terreni cromogenici impiegabili in microbiologia clinica, è recente l'introduzione sul mercato di substrati che, accanto ad un'identificazione presuntiva di microrganismi, in base a proprietà morfologico-tintoriali, consentono di verificare la presenza o meno di resistenze a particolari molecole antibiotiche.

Scopo di questa indagine è stato quello di verificare l'efficacia di un terreno cromogenico selettivo di recente introduzione (Agar ChromID™ ESBL-BioMerieux) utilizzabile per lo screening di enterobatteri produttori di ESBL.

Le nostre osservazioni sono riferibili a 200 stipti di enterobatteri di isolamento clinico. L'identificazione degli stipti è stata ottenuta mediante Card ID-GN Vitek2 mentre la suscettibilità a cefalosporine di IIIa generazione è stata ottenuta mediante Card AST-N040. Il rilevamento di ESBL è stato dedotto utilizzando il sistema esperto dello strumento. Tali campioni sono stati quindi saggiati sul terreno cromogenico mediante tecnica a spot, verificandone la crescita e gli aspetti tintoriali. I campioni che hanno fornito risultati discordanti, sono stati ritestati con i due sistemi, contemporaneamente ad un saggio fenotipico mediante tecnica del doppio disco in agar diffusione. Le valutazioni sono state espresse in termini di valori predittivo negativo e positivo.

002

STUDIO RETROSPETTIVO SULLE INFEZIONI DA MICOBATTERI NEL PERIODO 2000-2006 A BERGAMO.

Arosio M., Moiola F., Raglio A., Passera M. Ferrari I., Grigis A., Goglio A.

Microbiologia e Virologia, Ospedali Riuniti di Bergamo.

Obiettivo. Descrizione degli aspetti epidemiologici e microbiologici dei campioni biologici giunti all'osservazione della USC di Microbiologia e Virologia di Bergamo per la ricerca di micobatteri.

Metodi. I dati sono stati estratti dall'archivio informatico della microbiologia ed elaborati con il software, Virtuoso plus (Metafora informatica s.r.l.).

Risultati. Nel periodo 2000-2006 sono giunti al nostro laboratorio 19.869 campioni per ricerca di Micobatteri, con una media/anno di 2.838, ed una positività media del 7.3%. L'incidenza degli isolati di *M. tuberculosis* complex è costantemente più elevata rispetto ai micobatteri non tubercolari (MOTT) con una media/anno di 162 (80%) rispetto ai MOTT 42 (20%). L'incidenza media annuale dei casi di infezione da micobatteri risulta di 124, rispettivamente 93 (75%) tubercolosi e 31 (25%) infezioni da micobatteri atipici. L'interessamento polmonare costituisce la maggior parte dei casi segnalati (73%); tra le forme extrapulmonari, si osservano con più frequenza le localizzazioni a livello linfonodale e renale rispettivamente 14% e 5%. L'incidenza per sesso è più elevata ed in leggera crescita nei maschi 62% rispetto alle femmine 38%. La sensibilità della PCR, avendo come riferimento l'esame colturale, è risultata del 71%, quella dell'esame microscopico del 30%, dati questi riferiti alla totalità dei materiali. Considerando soltanto i campioni respiratori la sensibilità dell'esame microscopico è risultata complessivamente del 48% (354/728), rispettivamente 41% (42/103) nel 2000, 43% (35/81) nel 2001, 47% (49/104) nel 2002, 47% (40/85) nel 2003, 52% (51/98) nel 2004, 52% (73/140) nel 2005 e 55% (64/117) nel 2006. La PCR è stata eseguita, tra il 2001 e il 2006, su 2.359 campioni; di questi 220 con esame colturale positivo per *M. tuberculosis* complex. La sensibilità è risultata complessivamente del 83% (243/293) ed in particolare 83% (34/41) nel 2001, 85% (45/53) nel 2002, 80% (32/40) nel 2003, 86% (38/44) nel 2004, 82% (51/62) nel 2005 e 81% (43/53) nel 2006.

Tra gli isolati di *M. tuberculosis* complex abbiamo rilevato resistenza ad almeno un farmaco di prima scelta nel 6% e di Multidrug-resistance (MDR) nell'1%.

Conclusioni. Le infezioni da Micobatteri continuano a rappresentare un problema per la salute pubblica. La Microbiologia, accertando tempestivamente la positività del campione, svolge un ruolo centrale nel controllo della malattia. I nostri risultati confermano quanto già osservato da altri Autori e forniscono utili informazioni per la richiesta e l'interpretazione dei test rapidi (es. microscopico e PCR).

003

STUDIO OSSERVAZIONALE MICROBIOLOGICO SULLE LESIONI ULCERATIVE DEL PIEDE DIABETICO PRESSO L'OSPEDALE CIVILE DI VENEZIA

Bergamasco M.¹, Moro E.², Santonastaso C.¹, Frison V.², Ambrosio G.B.², Gion M.¹

¹Laboratorio Analisi Ospedale Civile di Venezia,

²Servizio di Diabetologia Ospedale Civile di Venezia.

Materiali e metodi. Le lesioni ulcerative del piede diabetico sono un terreno ideale per l'attecchimento di specie batteriche che rappresentano una delle cause di ritardata o mancata guarigione delle lesioni stesse. In questo studio osservazionale sono stati considerati, in un periodo di 6 mesi, da luglio 2006 a gennaio 2007, 46 pazienti diabetici portatori di lesioni ulcerative ai piedi affluiti consecutivamente al Servizio di Diabetologia dell'Ospedale Civile di Venezia. Nei 6 mesi dello studio i pazienti sono stati sottoposti da un minimo di 1 fino ad un massimo di 5 osservazioni cliniche e microbiologiche che si sono protratte fino alla guarigione delle lesioni. Durante la prima valutazione 2 pazienti presentavano 3 isolati batterici, 15 ne evidenziavano 2, mentre 28 avevano solo un isolato batterico. In questa prima osservazione i due pazienti che avevano 3 isolamenti batterici presentavano uno *Staphylococcus aureus* oxacillino resistente e due Enterobatteriacee, mentre l'altro paziente aveva uno *S. aureus* oxacillino sensibile, una *P.aeruginosa* e una *Escherichia coli*. Entrambi i pazienti sono usciti subito dallo studio poiché rispondevano positivamente alla terapia antibiotica. Nel gruppo di pazienti che presentavano 2 germi alla prima valutazione i Gram positivi (*Staphylococchi*, *Streptococchi* e *Corynebatteri*) incidono al 46% quasi come i Gram negativi (non fermentanti e enterobatteriacee) al 47%, mentre i lieviti sono al 7%. Guardando nel dettaglio i batteri Gram positivi *S.aureus* occupa il 27%, contrariamente agli *Staphylococchi* coagulasi negativi che sono solo al 3%. Interessante vedere come *Streptococchi* (10%) e *Corynebacterium striatum* (3%) incidano tra i Gram positivi. Questo ultimo in particolare possiede una spiccata antibiotica resistenza che rende difficile l'eradicazione. Tra i Gram negativi, *P. aeruginosa* è al 27% contro il 23% delle Enterobatteriacee. Osservando invece i pazienti che avevano un solo isolato batterico e che erano i più numerosi del gruppo, 28 casi, abbiamo trovato 9 casi di *S.aureus* oxacillino sensibile (31%), 3 di *S.aureus* oxacillino resistente (11%), 7 *Staphylococchi* coagulasi negativi (25%), 5 *Corynebacterium* spp. (18%), 3 *Pseudomonas aeruginosa* (11%) e uno *S.agalactiae* (4%). I batteri Gram positivi incidono dunque per l'89% mentre i Gram negativi, tutte *Pseudomonas aeruginosa*, sono all'11%. Non si sono rilevati lieviti in questi pazienti. Alla seconda osservazione 28 pazienti erano usciti dallo studio guariti per i 6 mesi seguenti. Rimanevano in osservazione 18 pazienti dei quali 9 presentavano un singolo germe e 9 doppio germe. In questa seconda osservazione i Gram negativi diminuiscono sia nel caso di singolo isolamento (22%) che di doppio isolamento (38%) mentre crescono gli *Staphylococchi* coagulasi negativi (34% negli isolamenti singoli e 17% negli isolamenti doppi). Tre casi di portatori di *Staphylococco* coagulasi negativo non erano guariti e mantenevano il germe anzi, ad uno

di questi, si sovrapponeva anche *Candida parapsilosis*. Nei casi restanti lo *Staphylococco* coagulasi negativo diventava il germe della nuova infezione. Nei casi con doppio isolamento batterico l'abbinata classica era *S. aureus* (non necessariamente oxacillino resistente) e *P. aeruginosa* o Enterobatteriacee. Un paziente continuava ad avere *Corynebacterium striatum* e un altro lo possedeva assieme a *S. aureus* oxacillino resistente. Alla terza osservazione rimanevano in osservazione 6 pazienti. Di questi 5 avevano un singolo germe e uno 2 germi. Di questi 6 pazienti 3 continuavano ad avere lo stesso *Staphylococco* coagulasi negativo che quindi non era stato eradicato. Col protrarsi dell'infezione nel piede diabetico, gli *Staphylococchi* coagulasi negativi aumentano sensibilmente superando anche *S. aureus*, questo per la loro oxacillino resistenza, la loro scarsa sensibilità agli antibiotici e per le problematiche inerenti il trattamento di questi pazienti. Alla quarta osservazione rimanevano solo 4 pazienti che non erano mai guariti e avevano sempre presentato gli stessi germi oppure, in un caso, alla guarigione dello *S. aureus* oxacillino resistente era rimasta *Candida parapsilosis*. Le *Candide* isolate da queste lesioni, inoltre, non sono mai *Candida albicans* ma sempre *Candide* ambientali. I germi che si selezionano durante i fallimenti terapeutici sono *S. aureus* oxacillino resistente, *Candida* spp. e Enterobatteriacee. Alla quinta e ultima osservazione rimanevano solo due pazienti che non erano guariti rispettivamente di uno *S. aureus* oxacillino resistente e di uno *Staphylococco* coagulasi negativo e di una *Candida parapsilosis*.

Conclusioni. I dati di questo studio osservazionale su una popolazione selezionata di pazienti diabetici affetti da lesioni ulcerative del piede ha evidenziato come alla prima osservazione i Gram positivi rappresentino la grande maggioranza dei germi quando vi è un unico isolato batterico ma che quando il numero di isolati aumenta i Gram negativi rappresentano circa la metà dei germi isolati. Nelle successive osservazioni si assiste ad una progressiva selezione di germi antibiotico resistenti che si accompagnano come atteso ad una ritardata o mancata guarigione delle lesioni.

004

RARO CASO DI MENINGITE DA STREPTOCOCCUS SUIIS II

Buonopane G., Taddeo M. L., Storti M., d'Argenio A..

Struttura complessa di Microbiologia A.O.R.N. "S. G. Moscati" Avellino

Nel mese di dicembre 2006 è stato ricoverato presso il reparto di Malattie Infettive un uomo di 42 anni, che lamentava da due giorni febbre di NDD (max 39°C), cefalea e fotofobia.

Al momento del ricovero il paziente presentava una temperatura di 38°C associata a rigidità nucale. Si praticava immediatamente rachicentesi con richiesta di esame chimico-fisico, ricerca di esantigeni ed esame colturale e si avviavano i seguenti esami di laboratorio: emocromo, VES, PCR, PT, PTT, fibrinogeno, parametri biochimici ed emocoltura. Venne subito intrapresa una terapia con Rocefin (2gr x 2 volte\die), Decadron, Ranidil, Fisiologica (500 ml x 2\die). Il liquor appariva lievemente torbido ed ematico, con sovrastante opalino, dopo centrifugazione.

I risultati dei parametri chimico-fisici furono i seguenti: proteine 185 mg/dl, glucosio 27 mg/dl, cloro 108 mmol/l, leucociti 160/mmc, eritrociti 200/mmc.

La ricerca degli esantigeni diede risultato negativo per *E. coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus gr.B*. Il liquor fu seminato sia in aerobiosi che in CO₂ e fu eseguito anche arricchimento in flacone BACTEC PEDS PLUS/F della BD. Dopo 24 h di incubazione, le piastre di agar sangue (O₂/CO₂) mostrarono la presenza di molte ufc. di *Streptococchi α-emolitici*. Tale positività fu subito comunicata al reparto che aggiunse alla terapia Amplital. Lo stesso microrganismo fu isolato da tutti i tre set di emocoltura. Il germe fu identificato con la galleria API 20 STREP Bio Merieux come *Streptococcus suis* II. Questo microrganismo si isola principalmente dai maiali, in cui causa setticemie con lesioni cerebrali ed articolari.

Nell'uomo sono stati descritti alcuni casi di meningite ed altre infezioni gravi soprattutto tra allevatori ed addetti ai macelli. Il paziente giunto alla nostra osservazione è risultato essere proprietario di una macelleria.

005

PRODUZIONE DI BETA-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO NEGLI ENTEROBATTERI: TECNICHE DI SCREENING E DI CONFERMA FENOTIPICA.

Cainarca M., Battaglioli L., Baccalini R., Tarricone C., Calvara C., Grimaldi C., Melzi d'Eril G.V.*

*Dipartimento di Medicina Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano, Milano

U.O. Laboratorio di Analisi, Azienda Ospedaliera San Paolo, Via di Rudini 8, 20142 Milano.

Introduzione. L'isolamento di ceppi produttori di beta-lattamasi (ESBL) ha apportato notevoli problemi terapeutici. Scopo dello studio è stato valutare l'affidabilità del sistema automatico VITEK 2 (bioMérieux), utilizzando la card AST-N041 utile per la rilevazione di germi produttori di ESBL ed attualmente convalidata per le sole specie di *E.coli* e *K. Pneumoniae*. Inoltre, si è scelto di testare tale card anche per *P. mirabilis* e *Enterobacter spp.*

Materiali e metodi. Sono stati studiati 145 ceppi (54 *E. coli*, 36 *K. Pneumoniae*, 27 *P. mirabilis* e 28 *Enterobacter spp*) isolati da urine, sangue, escreti e pus di soggetti ospedalizzati durante il periodo marzo 2005 - settembre 2006 presso l'Ospedale San Paolo di Milano. Sono state eseguite identificazioni ed antibiogrammi degli isolati batterici con il sistema VITEK 2 (card ID-GN e AST-041) e test del doppio disco per la conferma della produzione di ESBL, secondo la tradizionale metodica di diffusione impiegando dischetti di ceftazidime, cefotaxime e ceftazidime/cefotaxime clavulanati. Un ceppo di controllo ATCC 700603 *K. Pneumoniae* è stato inserito in ogni seduta.

Risultati. Con il sistema VITEK 2 sono risultati produttori di ESBL 77/145 ceppi (25 *E. coli*, 21 *K. Pneumoniae*, 12 *P. mirabilis*, 19 *Enterobacter spp*), i rimanenti 68 sono risultati negativi alla produzione di ESBL. Con il test del doppio disco si sono confermati produttori 75/145 ceppi (24 *E. coli*, 21 *K. Pneumoniae*, 12 *P. mirabilis*, 18 *Enterobacter spp*), i rimanenti 70 sono risultati negativi. In due casi (1 *E. coli* e 1 *Enterobacter spp*) non è stata confermata la produzione di ESBL.

Conclusioni. Sui ceppi testati il sistema automatico risulta al 100% affidabile per la rilevazione di Enterobatteri non produttori di ESBL. La concordanza tra il sistema automatico ed il metodo classico sui ceppi produttori è del 100% per *K. Pneumoniae* e *P. mirabilis*, del 96% per *E. coli* e del 91% per *Enterobacter spp*. Nel complesso la concordanza tra le due metodiche su un totale di 145 ceppi risulta del 97,4%. L'automazione fornisce un metodo rapido per la rilevazione di Enterobatteri produttori di ESBL, ma risulta doveroso applicare il metodo di conferma in quanto il VITEK 2 tende a sovrastimare tale produttività. Tutto ciò per consegnare al clinico risultati accurati in modo da evitare l'uso di antibiotici tossici e costosi.

006

SCREENING E SORVEGLIANZA DEI CONTATTI DI UN CASO DI TB IN UNA SCUOLA ROMANA PER LA VALUTAZIONE DELL'INFEZIONE DA *M. tuberculosis*.

Bernassola M.¹, Romano S.¹, Visca M.¹, Longo R.¹, Cappiello G.¹, Cava MC.¹, Ronchi I.¹, Zappa MC.², Mattioli F.², Trequattrini T.², Spano' A.¹

¹UOC Microbiologia, Virologia ed Immunologia

²UOC Pneumologia - Ospedale S. Pertini - Roma

Introduzione. Nei paesi industrializzati a bassa prevalenza di malattia tubercolare, la diagnosi e il trattamento dell'infezione latente da *Mycobacterium tuberculosis* (ITBL) costituiscono l'elemento chiave per il controllo e la riduzione della diffusione della malattia. A tal fine nei casi di tubercolosi polmonare (TB) risulta fondamentale lo screening dei contatti.

Materiali e metodi. In una scuola media superiore romana (età media alunni 15,4 anni) viene accertato un caso di TB in una alunna che nei due mesi di frequenza precedenti la diagnosi, aveva lamentato una sintomatologia simil-influenzale. Si è proceduto al controllo dei contatti stretti secondo quanto previsto dalle linee guida. Alunni della stessa classe e docenti sono stati sottoposti a screening mediante TINE TEST (TCT) (test Mantoux momentaneamente non disponibile). Ciò ha consentito di individuare un altro caso di TB in un alunno con TCT fortemente positivo (reazione di tipo flittenulare) ed RX torace suggestivo di TB. Si è deciso di estendere lo screening sottoponendo alunni e docenti ad indagine radiologica e al test QuantiFERON-TBGold (QTF), visto l'elevato numero di positivi al TCT nel campione rispetto alla media italiana (12%). Per i negativi al QTF si è effettuato un controllo dopo 6 settimane.

Risultati. 19/28 alunni sono risultati negativi al TCT, 9/28 positivi; i 10 docenti sono risultati tutti negativi. La positività totale è risultata pari al 24%. Al QTF sono risultati negativi 15/28 alunni e 12/28 positivi, 4 dei quali erano negativi al TCT; i docenti sono risultati tutti negativi. Del gruppo dei negativi (15 alunni e 10 docenti) ricontrollato con il QTF dopo 6 settimane, è risultato positivo un altro paziente.

Per i positivi al QTF abbiamo iniziato profilassi con isoniazide al dosaggio di 300mg/die per 6 mesi (trattamento in corso).

Discussione. E' evidente la necessità di uno screening dei contatti stretti dei pazienti TB per limitare la diffusione della malattia. In tal senso va considerata la maggiore sensibilità del QTF che ci ha consentito l'individuazione di 4 casi di ITBL non rilevati dal TCT e di un'ulteriore positività a sole 6 settimane di distanza dal primo screening.

007

ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI STAFILO ED ENTEROCOCCI: INDAGINE RETROSPETTIVA (ANNI 2004, 2005, 2006)

Carcheri M., Ventura A., Bellucci E., Caligiuri P., Chiossone I., Ferretti A., Graziani A., Lacitignola G., Milano P., Muselli L., Tassi L., Capuzzo R.

U.O. Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche

- Dipartimento di Patologia Clinica

- Azienda Ospedaliera "Villa Scassi", corso Onofrio Scassi 1

- 16149 Genova

Introduzione. Negli ultimi decenni sono stati segnalati casi sempre più frequenti di stafilococchi meticillino-resistenti, così come sono noti casi di enterococchi resistenti alla vancomicina e ultimamente sono stati segnalati anche casi di *S.aureus* vancomicina-resistenti. In questo studio sono stati presi in esame i dati epidemiologici riguardanti gli anni 2004, 2005 e 2006 per valutare la prevalenza di stafilococchi resistenti a meticillina e vancomicina ed *E.faecalis/faecium* vancomicina-resistenti nel bacino d'utenza dell'A.O.Villa Scassi di Genova.

Materiali e metodi. In un primo approccio di screening l'identificazione e l'antibiogramma sono stati eseguiti con lo strumento automatico VITEK (Biomerieux) più una contemporanea semina su terreno MRSA ID. In caso di discordanza tra i due metodi è stato valutato l'alone di inibizione con dischetto di cefoxitina secondo metodica CLSI. La resistenza alla vancomicina è stata confermata con E-test. Una parte delle meticillino-resistenze di *Staphylococcus spp.* e' stata confermata mediante amplificazione del gene *mecA*.

Risultati. Nel periodo esaminato gli *Enterococcus* vancomicina-resistenti rappresentano il 5.49% degli isolati totali, con una netta discrepanza tra il 36.64% di *E.faecium* e il 2.64% di *E.faecalis*. Gli *Stafilococcus spp.* meticillino-resistenti risultano il 50% del totale, di cui 36% *S.aureus* e 74% Stafilococchi coagulasi-negativi. Nel periodo esaminato è stato riscontrato un decremento degli isolati di *S.aureus* (dal 60% del 2004 al 40% del 2006) e un incremento degli stafilococchi coagulasi negativi (dal 28% del 2004 al 49% del 2006). Per questi ultimi la meticillino-resistenza è rimasta costante, attorno al 70% mentre per *S.aureus* è passata dal 61% del 2004 al 40% del 2006. Non sono stati isolati stafilococchi vancomicina-resistenti.

Conclusioni. I risultati confermano l'ampia diffusione dei ceppi MRSA e MRSE mentre i casi di enterococchi vancomicina-resistenti risultano essere ancora abbastanza rari. Il test di biologia molecolare potrebbe risultare un valido supporto nella definizione dei casi dubbi.

008

SORVEGLIANZA DELLA COLONIZZAZIONE DA *MYCOBACTERIUM ABSCESSUS* IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Garlaschi M.L.*, Cariani L.*, Costantini D.[^], Russo M.C.[^], Clarizia G.*, D'Accio M.*, Daprai L.* e Torresani E.*

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

[^]Centro di Riferimento Regionale Fibrosi Cistica.

Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano

Introduzione. Il *Mycobacterium abscessus* è un micobatterio non tubercolare (NTM) a rapida crescita (RGM), che può causare malattia polmonare in pazienti affetti da Fibrosi Cistica. *M. abscessus* è un bastoncino Gram positivo, ubiquitario, nosocomiale, si ritrova nell'ambiente ospedaliero, nel suolo, e nelle acque.

Scopo dello studio è valutare la colonizzazione da *M. abscessus* in rapporto al loro stato clinico e la contemporanea colonizzazione da altri patogeni. **Pazienti e metodi.** Sono stati valutati 10.200 campioni di espettorato/aspirato naso faringeo raccolti da 447 pazienti pediatrici e 120 pazienti adulti. Il periodo dello studio è compreso fra ottobre 2003 e giugno 2007.

I campioni di espettorato/aspirato naso faringeo per la ricerca di *M. abscessus* sono stati seminati su BCSA (BioMerieux) terreno selettivo per *Burkholderia cepacia* complex e incubati per 72 h in termostato a 37°C in atmosfera aerobia e per altri 10gg a temperatura ambiente.

I ceppi isolati sono stati genotipizzati mediante GenoType[®] *Mycobacterium* CM (Hain Lifescience, ARNIKA s.r.l.).

Risultati. 45pz. su 567pz. pari all' 7.9% sono risultati positivi per *M. abscessus*. 11pz. ebbero colture ripetutamente positive per *M. abscessus*. I microrganismi associati sono stati in 5 casi *P.aeruginosa* e *S.aureus*, in 4 *S. aureus*, in 3 *A.fumigatus*. Nella nostra casistica 2 pazienti su 11 presentavano un quadro clinico suggestivo per malattia polmonare da NTM. trattati con terapia antibiotica la loro funzionalità respiratoria è ritornata ai valori basali.

Conclusioni. Alcuni aa suggeriscono che colture multiple positive, indicano malattia, soprattutto quando accompagnate da sintomi polmonari. È indicato inoltre che il perdurare della colonizzazione può portare a sviluppare, nel giro di pochi mesi, malattia grave anche ad esito sfavorevole.

L'aumento di prevalenza di *M. abscessus* nella popolazione con Fibrosi Cistica e la sua implicazione nella malattia cronica polmonare, devono indurre ad attivare specifici programmi di sorveglianza, sia dal punto di vista clinico che microbiologico.

009

SEPSI FATALE DA *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ASSOCIATA A TRASFUSIONE DI SANGUE

Casolari C., Venturelli C., Piccinini L., Montagnani G., * Bensi L., * Meacci M., Fabio G., Nanni N., Tagliazucchi S., Bertazzoni G., Mantovani G., Marchegiano P**., Rumpianesi F., De Palma M.*

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Integrata Ospedaliero-Universitaria, Modena

* Servizio di Medicina Trasfusionale, Azienda Integrata Ospedaliero-Universitaria, Modena

** Direzione Sanitaria, Azienda Integrata

Ospedaliero - Universitaria, Modena

Introduzione. *Yersinia enterocolitica*, solitamente responsabile di affezioni intestinali o di gravi quadri sistemici in pazienti immunocompromessi, è raramente documentata all'origine di casi fatali di shock settico a seguito di trasfusioni di sangue contaminato. La sua capacità di svilupparsi a +4°C conferisce alle sacche contaminate e conservate per giorni in frigorifero concentrazioni elevatissime di microrganismi e di prodotti tossici. L'origine della contaminazione viene in genere correlata ad una batteriemia asintomatica del donatore.

Caso clinico, materiali e risultati. Nel novembre 2006, nel reparto di Terapia Intensiva Post Operatoria del nostro ospedale, avveniva il decesso di un paziente cirrotico di 52 anni, candidato al trapianto di fegato, per uno shock settico a seguito di una trasfusione di sangue. Colture del paziente (sangue e liquido ascitico) risultavano positive per *Y. enterocolitica*. Lo stesso microrganismo si isolava in carica elevatissima dalla sacca trasfusa mantenuta per una ventina di giorni in frigorifero dopo la donazione. La tipizzazione molecolare degli isolati confermava la loro totale similarità. Il donatore ricordava un lieve episodio intestinale qualche tempo prima del prelievo; sottoposto ad indagini colturali e molecolari per la ricerca di *Y. enterocolitica* a partire dalle feci e dal plasma frazionato il giorno della donazione, risultava tuttavia negativo, così come alla ricerca anticorpale. Altre sacche ottenute nella stessa seduta di prelievo non avevano dato alcuna reazione.

Conclusioni. La negatività di tutte le indagini sul donatore non ha permesso in questo caso di accertare l'origine della contaminazione. Questi imprevedibili eventi post trasfusionali hanno una bassissima incidenza (1: 6.000.000) ma una gravità estrema. In particolare *Y. enterocolitica* ha effetti drammatici per la sua capacità di moltiplicazione a temperatura di frigorifero. Considerando la larga diffusione del microrganismo e le fatali conseguenze che può determinare, si impone un approfondimento dell'anamnesi dei donatori considerando con estrema attenzione anche pregressi disturbi intestinali di lieve entità. Indagini sierologiche su un centinaio di donatori sono in corso per verificare l'incidenza di infezione nella nostra area.

010

UTILIZZAZIONE DEL SISTEMA URO-QUICK PER LA DETERMINAZIONE RAPIDA DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI BATTERI ISOLATI DA URINE

Colonna S., Bonanno C.L., De Sandro M.V., Nati R., Passerini R., Rosati C., Cava M.C., Spano' A.

U.O.C. Microbiologia Virologia e Immunologia, ASL Rm-B, Ospedale S. Pertini - Roma

L'Uro-Quick (UQ) è un sistema nefelometrico automatizzato per lo screening delle batteriurie che può essere impiegato anche per l'esecuzione dell'antibiogramma in 180-300 minuti, allo scopo di dare una valutazione dell'infezione delle vie urinarie in meno di 12h dall'accettazione del campione.

In questo studio su pazienti con sospetta infezione delle vie urinarie, le sensibilità dei batteri agli antibiotici, rilevate con l'UQ (batteriuria >50.000 UFC/ml) sono state confrontate con il sistema Vitek2 (VT2), utilizzato routinariamente. Sui campioni positivi veniva eseguita la colorazione di Gram per una identificazione eziologica presuntiva ed allestire un antibiogramma mirato.

Apposite cuvette UQ, prima addizionate con quantità prestabilite di antibiotico tali da raggiungere una concentrazione nel range di *breakpoint*, venivano successivamente inoculate con 0.5ml di brodocoltura da cuvette utilizzate per lo screening e diluite sino a ottenere una sospensione batterica di 5×10^5 cellule/ml. Per ogni dosaggio veniva allestito un controllo di crescita "bianco" privo di antibiotico. In parallelo, i campioni venivano seminati sui terreni agarizzati per l'identificazione di specie e l'antibiogramma (card VT2).

Considerando che *E.coli* ed *E.faecalis* sono gli agenti etiologici più frequenti d'infezione urinaria, sono stati valutati per i gram-negativi gli antibiotici piperacillina (PIP), piperacillina-tazobactam (PZT), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GEN), co-trimoxazolo (SXT); per i gram-positivi ampicillina (AM), CIP, vancomicina (VA), linezolid (LZD). Sono stati comparati 44 ceppi di *E.coli* e 22 di *E.faecalis*, includendo solo i campioni mono-microbici al Gram e alla coltura. La lettura finale eseguita in continuum contro "bianco" dall'UQ ha richiesto tempi di 3h per i Gram-negativi e 5h per i Gram-positivi.

E.coli sensibilità UQ vs VT2: PIP-sensibili 34/44 vs 32/44; CIP-sensibili 32/44 vs 34/44, SXT-sensibili 37/44 vs 41/44; concordanza per PZT e GEN.

E.faecalis sensibilità UQ vs VT2: AM-sensibili 18/22 vs 20/22, CIP-sensibili 10/22 vs 16/22; concordanza per LZD e VA.

I dati ottenuti, ancora preliminari, depongono favorevolmente per l'applicazione del sistema UQ nella determinazione di un antibiogramma rapido, con un ristretto numero di antibiotici di 1° e 2° scelta utili ad una terapia mirata. Da considerare i tempi di refertazione inferiori (10h) rispetto ai metodi tradizionali (48h), soprattutto per infezioni sostenute da *E.coli*.

011

QUANTIFERON-TB GOLD IN TUBE: DUE ANNI DI ESPERIENZA NELLA ROUTINE QUOTIDIANA

Chiaradonna P., Natili S., Tronci M.

U.O.C. Microbiologia e Virologia Azienda Ospedaliera San Camillo - Forlanini Roma.

Introduzione. Il test *QUANTIFERON-TB GOLD in tube* è stato introdotto in routine nella nostra U.O.C., nel 2005.

Lo studio retrospettivo ha lo scopo di valutare:

- 1) la sensibilità del test nei confronti della malattia tubercolare attiva confermata dalla coltura
- 2) il comportamento del test da solo e, ove possibile, in confronto al TST negli operatori sanitari, nei contatti di casi di TB bacillifera, in pazienti immunocompromessi non HIV.

Materiali e Metodi. 545 soggetti sono stati valutati per QF, di questi 139 erano operatori sanitari, 138 pazienti con sospetta TB, 175 contatti di casi di TB bacillifera e 93 pazienti immunocompromessi non HIV.

Nei pazienti con sospetta TB attiva è stato eseguito l'esame culturale. Il TST è stato praticato a tutti gli operatori sanitari e, su base volontaria, nelle altre categorie. E' stata riportata l'eventuale vaccinazione con BCG.

Risultati. Dei 138 pazienti con sospetta TB, 53 hanno avuto un esame culturale positivo per micobatteri (48 MTB complex e 5 MOTT); la sensibilità di QF è risultata dell'87,5% \pm 8,8. Lo studio di 139 operatori sanitari ha presentato una concordanza tra TST e QF del 56% (79/139). La percentuale di vaccinati con BCG era 40,8%. Nei 175 contatti divisi in: professionali (40) con il 22,5% di vaccinati, stretti (54) con il 14,8% di vaccinati e generici (81), il QF è risultato positivo rispettivamente nel 17,5%, nel 55,5% e nel 35,8%. Tra gli immunocompromessi 10/93 presentavano QF indeterminato, 34/93 QF positivo, 42 soggetti avevano QF e TST con una concordanza del 57,1%.

Conclusioni. QF ha mostrato una buona sensibilità nei pazienti con TB attiva accertata (87,5% \pm 8,8). Negli operatori sanitari e nei contatti, per l'alta percentuale di vaccinati, la specificità del QF è stata decisiva per l'eventuale chiemioprofilassi. Il numero dei soggetti immunocompromessi studiati non è ancora sufficiente per una valutazione definitiva.

012

VALUTAZIONE DELLE ANTIBIOTICO-RESISTENZE DI GRAM-NEGATIVI ISOLATI DA PAZIENTI CON INFEZIONE DELLE VIE URINARIE

Crapolicchio A., Lacerenza A., Lops C., Mazzilli F., Valenza R.

ASL BA, U.O. Patologia Clinica P.O. "Umberto I" Corato (BA)

Introduzione. Le infezioni delle vie urinarie rappresentano un problema terapeutico a causa della loro prevalenza nell'ambito delle infezioni nosocomiali o acquisite in comunità. Sempre più evidente è la comparsa di meccanismi di resistenza batterici causati dalla esposizione agli antibiotici. Scopo di questo lavoro è stato valutare i dati relativi alle sensibilità dei Gram-negativi isolati da urino-culture nell'Unità di Patologia Clinica-P.O. "Umberto I" - Corato tra novembre 2005 e aprile 2007 (18 mesi).

Metodi. L'esame colturale delle urine è stato effettuato mediante semina del campione su dip-slide (37°C per 24 ore); per i campioni risultati positivi si è proceduto a identificazione biochimica e al test di sensibilità agli antibiotici (Vitek1, BioMerieux, Italia).

Risultati. Su 2788 campioni provenienti da 1916 pazienti ambulatoriali (69%) e da 872 pazienti ricoverati presso i reparti di degenza (31%), 733 campioni (26%) sono risultati positivi: la loro tipizzazione ha rivelato la presenza di *E.coli* in 554 (76%) dei casi, *K.pneumoniae* in 72 (10%), *P.mirabilis* in 40 (5%), *P.aeruginosa* in 20 (3%). Altri Gram-negativi sono stati rinvenuti in percentuali inferiori. L'analisi delle antibiotico-resistenze tra ceppi provenienti da pazienti ambulatoriali e da pazienti interni non ha rivelato differenze significative. I Gram-negativi più frequentemente isolati hanno mostrato una significativa resistenza all'ampicillina (48% *E.coli*, 96% *K.Pneumoniae*, 63% *P.mirabilis*). *K.pneumoniae* e *P.mirabilis* sono risultati resistenti, rispettivamente, nel 22% e nel 92% dei casi alla nitrofurantoina. Abbiamo evidenziato una resistenza a trimetoprim/sulfametossazolo (SXT) (28% *E.coli*, 45% *P.mirabilis*, 76% *P.aeruginosa*), farmaco tuttora raccomandato come trattamento empirico di prima linea. *P.aeruginosa* mostra inoltre resistenze a nitrofurantoina (88%), ad ampicillina (89%) a piperacillina (28%).

Conclusioni. Anche nella nostra realtà locale si è evidenziata l'insorgenza di resistenze a farmaci solitamente utilizzati per la terapia delle infezioni delle vie urinarie. Ciò rende necessario lo sviluppo di dati epidemiologici locali per ottimizzare la scelta dei farmaci per una eventuale tempestiva terapia empirica.

013

ISOLAMENTO DI S.AGALACTIAE IN DONNE IN GRAVIDANZA. L'ESPERIENZA DELL'U.O. PATOLOGIA, P.O. "UMBERTO I", CORATO

Crapolicchio A., Lacerenza A., Lops C., Mazzilli F., Valenza R.

ASL BA, U.O. Patologia Clinica P.O. "Umberto I" Corato (BA)

Introduzione. Le infezioni da *Streptococcus agalactiae* di gruppo B intra-parto materne costituiscono un importante fattore di rischio di insorgenza di patologia neonatale. La trasmissione avviene dopo l'inizio del travaglio e lo screening colturale del secreto vaginale a gravidanza inoltrata, può identificare donne portatrici d'infezione. Scopo di questa indagine è stato valutare la frequenza di isolamento di *Streptococcus agalactiae* in tamponi vaginali di donne in gravidanza (35^a-37^a settimana) afferenti all'Unità di Patologia Clinica - P.O. "Umberto I" - Corato.

Metodi. Sono stati analizzati i tamponi vaginali con richiesta specifica di ricerca di *Streptococcus agalactiae* giunti presso il nostro laboratorio nell'anno 2006 (12 mesi). L'esame colturale dei tamponi è stato eseguito mediante semina diretta su Agar Columbia CNA e incubazione a 37°C per 24 ore; i campioni positivi, sono stati sottoposti a identificazione biochimica e valutazione della sensibilità agli antibiotici in uso (VITEK1, BioMerieux, Italia).

Risultati. Su 112 tamponi analizzati, 19 (17%) sono risultati positivi per la presenza di *Streptococcus agalactiae*. Al fine di ridurre la trasmissione verticale del batterio e la conseguente sepsi neonatale, durante il travaglio le gestanti portatrici sono state sottoposte a profilassi antibiotica con penicillina o macrolidi (eritromicina) nei casi di ipersensibilità alla penicillina: l'analisi delle antibiotico-resistenze dei ceppi isolati non mostrava resistenze significative nei confronti dei farmaci utilizzati. Sui neonati generati da madri infette, è stata effettuata terapia con penicillina ad ampio spettro e successivamente si è proceduto al controllo degli indici di flogosi.

Conclusioni. L'incidenza relativa all'infezione da *Streptococcus agalactiae* è in linea con quanto osservato in altri paesi europei (10-20%). Non si è osservato nessun caso di patologia neonatale da *Streptococcus agalactiae* da madri portatrici del batterio: ciò conferma l'importanza della prevenzione in quanto l'individuazione dello stato di portatore e la conseguente terapia antibiotica riducono in maniera significativa la trasmissione verticale e la sepsi neonatale.

014

CQI PER IL SISTEMA DI IDENTIFICAZIONE ED ANTIBIOGRAMMA IN USO NELL'A. O. MONALDI - NAPOLI -

Cuccurullo, S., Di Cecio, M., Naddeo, V., Simeone, M., Falca, M., Smeraglia, R.

U.O.C. Microbiologia e Virologia
Direttore Prof. R. Smeraglia
A.O.R.N. V. Monaldi - Napoli

Introduzione. Il concetto di Controllo di Qualità riferito agli esami di laboratorio si è esteso negli ultimi anni da una verifica della sola fase analitica ad una valutazione di qualità "globale", intesa come verifica di tutto il complesso iter diagnostico, dal momento della richiesta (fase pre-analitica) fino all'utilizzo clinico del dato (fase post-analitica). Anche nella nuova e più ampia prospettiva, restano di fondamentale importanza l'organizzazione del Controllo Interno di Qualità (CQI) e la partecipazione ad iniziative di Controllo interlaboratori. La normativa vigente parla di CQI "minimo" in Microbiologia e Virologia. I presupposti e le condizioni indispensabili per la realizzazione di un programma di CQI vanno dalla consapevolezza della sua importanza, alla volontà di accettare l'aumento del carico di lavoro, la necessità di effettuare una procedura scritta delle varie fasi analitiche con relativa attribuzione di responsabilità. Scopo del lavoro è di riportare la nostra esperienza sul CQI in Batteriologia di un'apparecchiatura utilizzata di routine per l'esecuzione delle identificazioni e degli antibiogrammi, molto diffusa per le sue peculiarità: il VITEK 2 Biomerieux.

Metodi. Disponiamo di ceppi ATCC per tutti i tipi di card utilizzati in routine subcolturali secondo la letteratura recente e le indicazioni fornite dalle case produttrici. È stato allestito un programma settimanale dettagliato, rispettato da tutti gli operatori, in modo da preparare quotidianamente: subcoltura del ceppo dalla coltura primaria di lavoro per il giorno successivo -relativa card di identificazione e/o antibiogramma da allestire in funzione del giorno della settimana.

Il programma VITEK prevede l'elaborazione dei risultati in automatico, sempre che ci sia una preliminare accettazione dei ceppi ATCC che dettagli il tipo di ceppo e il lotto di riferimento e la stampa dei risultati "non conformi" avviene appena il dato è disponibile, mentre è possibile la visualizzazione e la stampa dei referti desiderati in ogni momento e per molteplici esigenze come l'archiviazione mensile dei risultati, come avviene nel nostro centro.

Risultati. Nel periodo 01/04/06 - 30/04/07 sono stati effettuati 355 tests di cui 135 ID con il 2,22 % di discrepanze e 220 ATB con il 4,54 % di difformità considerando la card in toto. In tutti i casi si è trattato di errori manuali dell'operatore, mai di alterazione di molecole nel lotto di card in uso.

Conclusioni. Il CQI fornisce informazioni sulla precisione ed accuratezza dei risultati, permette cioè di validare quotidianamente le relative procedure analitiche di tutto il flusso di lavoro consentendo, pertanto eventuali interventi correttivi immediati.

015

UTILITÀ DEL TEST QUANTIFERON®-TB GOLD IN TUBE PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS NEI PAZIENTI CANDIDATI AL TRAPIANTO DI FEGATO.

Dal Monte P., Paolucci M., Pavoni M., Biagetti C., Morelli C., Ballardini G., Verucchi G., Sambri V.

Dipartimento di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale, Università degli Studi di Bologna

Introduzione. La diagnosi di infezione latente da *Mycobacterium Tuberculosis* (TB) è difficile da diagnosticare nei pazienti candidati al trapianto di fegato (OLT) a causa della frequente mancanza di reattività nei confronti del test tubercolinico (TST). Recentemente sono stati sviluppati nuovi test su sangue basati sul rilascio di interferon- γ (IGRA) in seguito a stimolazione antigenica con peptidi specifici per TB. Tra questi il QuantiFERON®-TB GOLD IN TUBE test, è stato approvato per la diagnosi di infezione tubercolare latente (LTBI) e sembra più sensibile e specifico del TST. Scopo di questo studio è quello di valutare l'utilità dei saggi IGRA nella diagnosi di LTBI in confronto al TST, in pazienti cirrotici candidati al trapianto.

Metodi. Sono stati inclusi in questo studio 43 pazienti con cirrosi di varia eziologia, con o senza epatocarcinoma (HCC), in attesa di OLT. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a radiografia toracica o tomografia per diagnosticare tubercolosi cicatrizzate, sottoposti al TST con 5UI di BIO-CINETEST PPD e al QuantiFERON®-TB GOLD IN TUBE test. La ricerca di micobatteri mediante esame colturale è stata eseguita su espettorato, urina e feci nella maggioranza dei pazienti.

Risultati. Nessuno dei 43 pazienti ha dato esito indeterminato al test QuantiFERON®-TB. I pazienti con test IGRA positivo sono risultati essere 19 (44%), di cui 15 (79%) erano TST positivi e 11 (58%) avevano anche immagini specifiche o storie cliniche rilevanti, come anche due di quattro TST-negativi/IGRA positivi. Solo due pazienti sono risultati essere TST positive/IGRA negative: uno ha riferito una precedente vaccinazione, mentre l'altro aveva immagini radiologiche specifiche. L'esame colturale per la ricerca di micobatteri è risultata negativa in tutti i pazienti.

Conclusioni. Il test QuantiFERON®-TB GOLD IN TUBE può rappresentare un importante strumento per identificare i candidati a trapianto a rischio di sviluppare tubercolosi.

016

INCIDENZA DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEI PATOGENI GRAM-NEGATIVI ISOLATI DA EMOCOLTURE.

Siddi A., Roveta S., Marchese A.

Sezione di Microbiologia - Di.S.C.A.T.,
Università di Genova, Largo R. Benzi 10, I 6132 Genova.

Introduzione. Sebbene i batteri Gram-positivi costituiscano i microrganismi di più frequente isolamento nelle emocolture, spesso i quadri clinici più gravi sono associati alla presenza di patogeni Gram-negativi. Questo studio epidemiologico locale è stato condotto per valutare l'incidenza dell'antibiotico resistenza nei Gram-negativi isolati da emocolture.

Metodi. Nel periodo gennaio-dicembre 2006, sono pervenute presso la Sezione di Microbiologia dell'Università di Genova 9840 emocolture. I campioni sono stati analizzati con il sistema automatico Bactec (Becton Dickinson) e quelli risultati positivi isolati e identificati con metodiche standard (Murray, 2003). Il pattern di antibiotico-resistenza è stato valutato tramite Kirby-Bauer (CLSI 2006). Sulle *Enterobacteriaceae* sono stati saggiati: ampicillina (AMP), amoxicillina/acido clavulanico (AMC), piperacillina-tazobactam (TZP), cefamandolo (MA), cefotaxime (CTX), cef-tazidime (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), gentamicina (GN), amikacina (AK), ciprofloxacin (CIP), cotrimossazolo (SXT), doxiciclina (DO), cloramfenicolo (CM). Sui Gram-negativi non fermentanti sono stati saggiati: carbenicillina (CAR), TZP, CTX, CAZ, FEP, ATM, IPM, GN, AK, CIP, XT e fosfomicina (FOS).

Risultati. I Gram-negativi costituivano il 24% dei 551 microrganismi isolati. Tra i fermentanti sono stati individuati 36 *E.coli*, 26 *Klebsiella* spp. (24 *K.pneumoniae* e 2 *K.oxytoca*) 16 *Enterobacter* spp. (14 *E.cloacae* e 2 *E.aerogenes*), 6 *Citrobacter freundii*, 5 *Serratia marcescens*, 2 *Proteus mirabilis*, 1 *Morganella morganii*, 1 *Pantoea agglomerans*, 1 *Salmonella* spp. Tra i Gram-negativi non fermentanti sono stati identificati 25 *Pseudomonas aeruginosa*, 7 *Stenotrophomonas maltophilia*, 3 *Acinetobacter* (2 *A.baumannii* e 1 *Acinetobacter* spp.) e 1 *Burkholderia cepacia*. Gli antibiotici maggiormente attivi sulle *Enterobacteriaceae* sono stati IPM (resistenza 1.3%), AK (10.2%) e FEP (13%). Tutti gli altri farmaci hanno mostrato resistenze superiori al 20%. Per quanto riguarda i non-fermentanti, solamente TZP, FEP e AK hanno fatto registrare resistenze inferiori al 20%.

Conclusioni. Le elevate percentuali di antibiotico-resistenza riscontrate in questo studio confermano che la diffusione di ceppi multi-resistenti nell'ambiente nosocomiale costituisce un problema di crescente gravità.

017

VALUTAZIONE GENOTIPICA CON PFGE E SENSIBILITÀ ANTIBIOTICA DI CEPPI DI A. BAUMANNII-CALCOACETICUS COMPLEX ISOLATI DA INFEZIONI NOSOCOMIALI.

¹Del Gaudio T., ¹Porzio M., ²Del Prete R., ²Mosca A.,
²Miragliotta G.

¹Laboratorio di Analisi P.O. "L. Bonomo", AUSL BAT Andria

²Sezione di Microbiologia, Dip. MIDIM, Università degli Studi, Policlinico, P.zza G. Cesare, 4, 70124-Bari.

Introduzione. *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex* (A.b.) è attualmente responsabile di gravi infezioni nosocomiali. La multiresistenza antibiotica (MDR) di tali microrganismi comporta inoltre un difficile approccio terapeutico. Sulla base delle osservazioni riportate in letteratura, abbiamo valutato il possibile effetto sinergico in vitro di colistina (C) ed imipenem (I) nei confronti di ceppi di A.b. isolati in corso di infezioni nosocomiali ed abbiamo comparato genotipicamente i ceppi studiati mediante PFGE.

Metodi. Per la valutazione della sinergia è stata utilizzata la metodica Etest (Biolife, Italia), sovrapponendo una striscia Etest di I sull'impronta di quella di C applicata in precedenza, in modo da far coincidere i valori MIC già noti dei rispettivi antibiotici. Era presente sinergia quando MIC di C in associazione con I risultava di 2 o più diluizioni inferiore a quella di C da sola. PFGE è stata eseguita mediante metodica standardizzata per i batteri Gram-negativi, utilizzando l'enzima di restrizione SMA 1. Sono stati considerati N.12 ceppi di A.b., identificati mediante VITEK 32 (bioMérieux, Italia) e selezionati in base alle caratteristiche fenotipiche di sensibilità antibiotica.

Risultati. Per tutti i 12 ceppi di A.b. valutati è stato osservato effetto sinergico tra C ed I (MIC di C 3/4 diluizioni inferiori). L'analisi del genotipo mediante PFGE ha evidenziato genotipi diversi.

Conclusioni. In vitro la diminuzione della MIC di C in associazione con I rappresenta una possibilità terapeutica ulteriore in caso di infezioni da A.b. MDR. Indagine genotipica con PFGE è di ausilio nello stabilire un'eventuale correlazione a livello genetico da germi MDR.

018

MYCOBACTERIUM BOVIS BCG: POSSIBILE FONTE DI ERRORE NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE

Fabio A., Pecorari M., Saredi G*, La Regina A., Sabbatini A.M.T., Gennari W., Nanni N., Mumolo S., Forbicini G., Mantovani G., Rumpianesi F., Casolari C.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia,

Azienda Integrata Ospedaliero-Universitaria, Modena

* U.O. Urologia, Azienda Integrata Ospedaliero-Universitaria, Modena

Introduzione. Il BCG (Bacillus Calmette- Guérin), derivato attenuato di un ceppo virulento di *Mycobacterium bovis*, viene normalmente utilizzato nel trattamento immunoterapico del carcinoma vescicale superficiale in base ad una sua comprovata efficacia nella profilassi delle recidive dopo resezione endoscopica e nella prevenzione della progressione alla malattia infiltrante. In seguito alle instillazioni endovesicali previste dai protocolli terapeutici, il BCG può dare flogosi e ritrovarsi nelle urine. I metodi convenzionali di diagnostica in PCR non sono in grado di differenziare i ceppi di BCG da ceppi patogeni di *M. bovis* e quindi dai membri di MTB complex. Segnaliamo un caso di positività colturale urinaria per BCG in un paziente con carcinoma vescicale, inizialmente diagnosticato come MTB complex e solo successivamente correttamente identificato con ulteriori test molecolari.

Caso clinico, metodi e risultati. Nel settembre 2006 perveniva al nostro laboratorio un campione di urina da un paziente dell' urologia per ricerca di micobatteri, senza informazioni relative a dati clinici e terapeutici. La coltura in terreno liquido si positivizzava nell' arco di 18 giorni. Il riconoscimento del ceppo con i metodi molecolari in uso indicava MTB complex. L' informazione veniva trasmessa tempestivamente al clinico che ricusava l' ipotesi di TBC informando il laboratorio di un errore nella richiesta. Il paziente era portatore di un carcinoma uroteliale vescicale asportato 3 mesi prima e stava praticando settimanalmente instillazioni endovesicali con BCG. Il ceppo isolato, sottoposto ad ulteriori prove molecolari, veniva identificato come *M. bovis* BCG. Ulteriori test in PCR venivano effettuati su campioni biotici vescicali, con risultati negativi.

Conclusioni. Questa nostra esperienza focalizza l' attenzione sui limiti della diagnostica molecolare per MTB complex normalmente utilizzata, che non discrimina il ceppo vaccinale attenuato dai ceppi patogeni. In assenza di informazioni cliniche fornite dal reparto si possono generare come nel nostro caso equivoci diagnostici. Il BCG presente nell' urina cresce in coltura come un tubercolare a tutti gli effetti e si identifica in prima battuta come tale. È pertanto assolutamente indispensabile procedere in questi casi ad ulteriori prove per identificare esattamente l' isolato.

019

USO DELL'UROQUICK™ PER LA COLTURA DELLE PUNTE DI CATETERI VASCOLARI

Fontana C^{1,2}, Reale L.², Bossa M.C.², Minelli S.², Cicchetti O.², Capalbo F.², Pelliccioni M.², Falcione F.², C.Favalli^{1,2}.

¹Dipart. Medicina Sper. e Sc. Biochimiche, - Università Tor Vergata - Via Montpellier 1, 00133 Roma

²Lab Microbiologia, - Policlinico Tor Vergata

- V.le Oxford 81 - 00133 Roma

Introduzione. L'uso dei cateteri venosi centrali (CVC) ha trovato nel corso degli ultimi anni un utilizzo sempre più diffuso. Essi rappresentano per alcune specialità cliniche, quali l'ematologia ed in particolare l'oncoematologia o più in generale per l'oncologia e/o per alcuni reparti critici, quali la terapia intensiva, un facile strumento per gestire accessi venosi e/o arteriosi. Se da un lato l'impianto di questi dispositivi migliora e facilita la gestione del paziente dall'altro lo espone ad un inevitabile rischio d'infezione. L'infezione catetere correlata (ICC) è causa di una più elevata morbilità e mortalità, comporta quasi inevitabilmente la rimozione del dispositivo. La diagnosi di ICC è di solito retrospettiva e si fonda sulla coltura qualitativa e quantitativa della porzione distale del catetere rimosso. Quest'ultima si avvale di diverse metodiche tutte, nella loro pur evidente diversità, inficiate da una bassa sensibilità. Spesso, infatti, il clinico pur avendo ragionevole certezza di ICC non trova conforto nei dati di laboratorio. Partendo dalle esperienze del nostro laboratorio, ove solo circa il 30% delle colture dei CVC rimossi forniva una evidenza di positività colturale, ci siamo proposti di sperimentare un nuovo e più efficiente sistema di coltura ed arricchimento dei microrganismi presenti sul CVC.

Metodi. la coltura dei CVC è stata effettuata tecnica di Maki modificata (che prevede una fase di vortexatura e centrifugazione aggiuntiva), ed affiancata dal prearricchimento della punta di CVC mediante sistema Uroquick™(Alifax), con tempi di lettura prolungati a 6 h (cut off microbico <15CFU/ml).

Risultati. Su un totale di 100 CVC esaminati per il 53% si è ottenuta la positività mediante Uroquick™ (con un cut/off significativo: ≥ 15 CFU/ml) a fronte di un modesto 35% ottenuto con la coltura tradizionale ($p < 0.007$). Gli isolati clinicamente significativi erano costituiti dai comuni Stafilococchi coagulasi-negativi e positivi, Enterococchi, Enterobatteri, Gram-negativi non fermentanti nonché lieviti.

Conclusioni. La significativa maggiore sensibilità del metodo UROQUICK™ rappresenta uno stimolo a proseguire lo studio su una campionatura più corposa, ma già in questa fase preliminare i dati ottenuti sono di estremo interesse clinico e diagnostico. Il recupero del 17% dei campioni ha fornito conferma diagnostica al sospetto clinico, con una conseguente ricaduta sull'approccio terapeutico del paziente.

020

VALUTAZIONE DI CICA BETA TEST, UN NUOVO METODO RAPIDO PER LA RILEVAZIONE DELLE ESBL, MBL E DEGLI ENZIMI DI TIPO AmpC

Frugoni S.¹, Barigozzi P.¹, Berlusconi A.¹, Binacchi C.¹, Consoli D.¹, Faravelli C., Iollo L.²

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

²D.I.D., Diagnostic International Distribution, piazza Amati 6, 20146 Milano

Introduzione. I moderni laboratori di microbiologia dispongono di strumentazioni che si avvalgono di sistemi esperti per una corretta interpretazione dell'antibiogramma. In diversi casi, senza una specifica determinazione delle ESBL, è il sistema esperto che ne rileva i probabili batteri produttori. Le tecniche di conferma della produzione di ESBL, attualmente richiedono tempi lunghi per l'allestimento di una terapia antibiotica immediata ed efficace. Con l'aumentare dei casi di infezione provocati da microrganismi produttori di ESBL, è sempre più importante disporre metodi diagnostici affidabili e rapidi per una specifica rilevazione di questi meccanismi di resistenza. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare un kit commerciale (Cica Beta kit) per la rilevazione rapida delle ESBL, MBL, e degli enzimi di tipo AmpC.

Metodi. Sono stati testati con la strumentazione automatica Vitek "senior" (BIOMERIEUX) con sistema esperto 66 ceppi segnalati ESBL produttori (29 *E.coli*, 6 *K.pneumoniae*, 26 *P.mirabilis*) e 5 ceppi *P.aeruginosa* imipenem resistenti. La produzione di ESBL è stata confermata con strip Etest (AB BIODISK), MBL con dischetti di imipenem con e senza EDTA, AmpC con dischetti di cefoxitina e cefepime. In parallelo è stato utilizzato Cica Beta kit (Kanto Chemical Co., Japan; Mast, UK) basato sulle caratteristiche del composto HMRZ-86 di essere scisso da ESBL e MBL. La rilevazione avviene in 15 minuti.

Risultati. Con Etest sono stati confermati 38 ceppi produttori di ESBL (27 *E.coli*, 6 *K.pneumoniae*, 5 *P.mirabilis*), 16 ceppi di *P.mirabilis* sono risultati produttori di AmpC, 6 ceppi (5 *P.aeruginosa*, 1 *P.mirabilis*) produttori di MBL; in 6 ceppi (4 *P.mirabilis*, 2 *E.coli*) non si è individuato nessun tipo di enzima. Cica Beta kit ha correttamente identificato tutti i ceppi produttori di enzimi del tipo AmpC, non ha rilevato 3 (8%) ESBL e 2 (33%) MBL; dei 6 ceppi non individuati con test di conferma, 3 (2 *P.mirabilis*, 1 *E.coli*) sono risultati produttori di ESBL e 3 ceppi (2 *P.mirabilis*, 1 *E.coli*) sono risultati produttori di enzimi multipli oxacillinas estesi. Il kit ha inoltre rilevato 3 ceppi produttori di enzimi multipli oxacillinas estesi, 3 *E.coli*, 1 *P.aeruginosa*, rispettivamente classificati con test di conferma come ESBL e MBL produttori.

Conclusioni. Cica Beta kit si è dimostrato un valido test di screening da utilizzare nella routine giornaliera per la rilevazione rapida di ESBL, MBL e degli enzimi di tipo AmpC.

021

VALUTAZIONE DI UNA TECNICA PER L'ALLESTIMENTO RAPIDO DI VETRINI DA FLACONI PER EMOCOLTURA CON CARBONE

Frugoni S., Barigozzi P., Binacchi C., Consoli D., Faravelli C., Berlusconi A.

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

Introduzione. Le batteriemie e le setticemie rappresentano ancor oggi una importante causa di morbidità nel paziente ospedalizzato. Impostare una corretta terapia antibiotica nel più breve tempo possibile è condizione importante per ridurre la sepsi soprattutto nel paziente immunocompromesso. I flaconi per emocoltura BacT/ALERT con carbone sono usati con il sistema di rilevazione microbica BacT/ALERT in procedure qualitative per migliorare il recupero e la rilevazione di microrganismi nel sangue. La presenza di carbone però ostacola la possibilità di effettuare l'identificazione e l'antibiogramma dell'agente eziologico direttamente dal flacone di coltura. Obiettivo del nostro lavoro è stato quello di valutare la possibilità di allestire vetrini per la colorazione di Gram direttamente dal flacone di coltura segnalato come positivo dallo strumento, al fine di fornire utili indicazioni per una immediata terapia antibiotica.

Metodi. I flaconi di coltura monouso BacT/ALERT (BIOMERIEUX) contengono 32 mL di terreno complessato e 8 mL di sospensione di carbone all'8,5%. I flaconi sono stati inoculati con 5-10 mL di sangue. Dai flaconi positivi, 7 mL della coltura sono stati trasferiti in provetta, in condizioni di sicurezza, utilizzando sistemi di prelievo sottovuoto e centrifugati a 5000 rpm per 3 minuti. Dal precipitato sono stati allestiti vetrini che, asciugati all'aria e fissati con metanolo anidro, sono stati colorati con la colorazione di Gram. Contemporaneamente sono state allestite colture in terreni idonei. Si sono confrontati i risultati.

Risultati. Sono stati allestiti 57 vetrini; all'esame morfologico tintoriale sono stati osservati 21 cocci gram positivi, 32 bacilli gram negativi, 1 lievito, 1 vetrino con cocci gram positivi e bacilli gram positivi (misto) e in 2 vetrini non è stato osservato alcun microrganismo (negativi). Dal confronto con le colture, si è osservata 1 sola discrepanza: mancata rilevazione dei batteri in 1 vetrino (errore minore) con coltura positiva per *S.epidermidis*. La coltura del campione risultò all'osservazione microscopica misto, ha evidenziato *Stafilococcus epidermidis* e *Corynebacterium spp.* La concordanza tra la lettura dei 56 vetrini e le colture è stata del 98,25%.

Conclusioni. La bassa percentuale di discrepanze ottenuta e il basso impatto nella routine di laboratorio, giustificano l'allestimento di vetrini per la colorazione di Gram direttamente dal flacone di coltura, al fine di impostare una terapia antibiotica in tempi brevi.

022

DIFFERENTE CAPACITÀ FAGOCITARIA DI MACROFAGI PERITONEALI MURINI VERSO *TREPONEMA DENTICOLA* IN CONDIZIONI ANAEROBIE E AEROBIE.

Gaibani P.¹, Vocale C.¹, Ambretti S.¹, Sambri V.¹

¹Sezione di Microbiologia, DMCSS,
Università degli Studi di Bologna.

Introduzione. *Treponema denticola* è uno dei principali microrganismi anaerobi coinvolti nella patogenesi della malattia paradontale. Di particolare interesse risulta quindi essere l'interazione che intercorre tra le spirochete orali e le cellule macrofagiche, parte integrante del sistema immune.

Metodi. *Treponema denticola* è stato coltivato in terreno NOS medium a +37 °C in condizioni di stretta anaerobiosi. La proteina maggiore di superficie (MSP) di *Treponema denticola* è stata estratta con una serie di centrifugazioni e successive estrazioni con detergenti.

Per ottenere un siero policlonale anti-MSP sono stati iniettati in coniglio 0,5 mg/ml di MSP nativa. I macrofagi sono stati estratti da topi BALB/c tramite lavaggio del peritoneo, diversi lavaggi in soluzione fisiologica e sospensione in terreno RPMI. Per le prove di fagocitosi i *treponemi* sono stati incubati in presenza delle cellule macrofagiche, che sono state in seguito fissate a diversi tempi d'incubazione (5,10,20,40,60 minuti) in condizioni di aerobiosi e anaerobiosi. Per valutare l'efficienza della fagocitosi, le cellule macrofagiche sono state osservate in immunofluorescenza indiretta (1:300 siero anti-MSP e 1:40 anti-rabbit marcato in FITC) e contato il numero di cellule positivi per campo microscopico a 400x. Come controllo di fagocitosi è stato utilizzato *T.denticola* incubato opsonizzato in vivo con siero anti-MSP.

Risultati. La valutazione della capacità fagocitaria delle cellule macrofagiche ha dimostrato come in condizioni di stretta anaerobiosi *T.denticola* riesca a evadere in maniera rilevante la fagocitosi. Allo stesso tempo in condizioni di aerobiosi la capacità fagocitaria risulta essere aumentata di circa il 50%.

È stato osservato come nelle medesime condizioni di stretta anaerobiosi *T.denticola* opsonizzato con anticorpi specifici per MSP risulti essere fagocitato con maggiore efficienza.

Conclusioni. I dati indicano come in condizioni simili a quelle presenti all'interno della tasca subgingivale, *T.denticola* riesca a sfuggire in modo significativo alla fagocitosi delle cellule macrofagiche, confermando così precedenti risultati ottenuti dal nostro gruppo che dimostrano la capacità, in un modello di topo SCID infettato a livello endodontico, di escape extra-orale di questa spirocheta.

023

VALUTAZIONE DI UN NUOVO TEST ELISA PER LA RICERCA DI ANTICORPI ANTI-*T. PALLIDUM* NEL SIERO DI SOGGETTI AFFETTI DA DIFFERENTI STADI D'INFEZIONE LUEITICA

Gaibani P., Marangoni A., Ambretti S., Sambri V.

Sezione di Microbiologia, DMCSS,
Università degli Studi di Bologna.

Introduzione. Tra i diversi approcci disponibili in laboratorio, l'utilizzo di tecniche immunoenzimatiche, quali ELISA e Western blot, per la ricerca di anticorpi anti-*Treponema pallidum*, risulta avere, ad oggi un ruolo di primaria importanza nella diagnosi microbiologica di sifilide.

Metodi. Questo studio è stato condotto su 100 differenti sieri positivi in western blot per la presenza di anticorpi specifici verso *T.pallidum* ed ottenuti da soggetti clinicamente definiti affetti da lue a diversi stadi di sviluppo. Sono stati inoltre valutati 92 sieri negativi, ottenuti da soggetti sani donatori di sangue. I campioni sono stati diluiti secondo le istruzioni del produttore del test, basato su antigeni ricombinanti adesi a pozzetti di micropiastre, ed incubati per 1 ora a +37 °C. Dopo i prescritti lavaggi l'immunocomplesso formato è stato incubato in presenza di anticorpi coniugati con perossidasi ed i conseguenti complessi immunologici-enzimatici sono stati evidenziati dall'incubazione con substrato cromogenico specifico e conseguente reazione con sviluppo di colore.

Risultati. 102 dei 103 campioni ottenuti da pazienti affetti da sifilide e positivi quando studiati in western blot sono stati confermati positivi dal test immunoenzimatico. I 92 campioni di siero ottenuti da donatori sani di sangue sono stati correttamente identificati come negativi dal test ELISA. La concordanza tra il nuovo test ELISA (DRG Diagnostic, Germany) e il western blot, eseguito con antigeni ricombinanti (recomBlot, Mikrogen, Germany) è stata confermata e stata del 99.5% per i campioni da pazienti sifilitici e del 100% per i sieri da donatore sano di sangue.

Conclusioni. I dati indicano come il nuovo T.P. screen ELISA DRG test possa essere utilizzato come strumento di laboratorio microbiologico nella ricerca di anticorpi specifici anti-*T.pallidum* nel siero o nel plasma vista l'elevata sensibilità e specificità di questo nuovo metodo.

024

PSEUDOMONAS AERUGINOSA: STUDIO DI ANTIBIOTICO RESISTENZA 2000-2005.

Gallo M.T., Prignano G., Belardi M., Cilli L., De Santis A., Stivali F., Ranazzi A., Ensoli F.

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

Introduzione. *Pseudomonas aeruginosa* è un agente patogeno opportunisto. E' soprattutto un agente patogeno nosocomiale in pazienti immuno-compromessi: secondo i CDC, l'incidenza generale delle infezioni da *P.aeruginosa* negli ospedali degli Stati Uniti è circa 0,4%, e queste costituiscono l'1% di tutte le infezioni ospedaliere.

P.aeruginosa è naturalmente resistente ad una vasta gamma di antibiotici. La relativa resistenza ai beta-lattamici anti-*Pseudomonas*, alle cefalosporine, ai monobattami e ai carbapenemi costituisce un problema clinico. Infatti, la prevalenza di ceppi resistenti agli antibiotici in uso è in aumento, soprattutto in seguito a trattamenti ripetuti. Lo sviluppo di meccanismi di resistenza da parte di *P. aeruginosa* sembra sia dovuto alla comparsa di molecole che trasportano geni che codificano carbapenemasi e amikacina acetil-transferasi. Inoltre, molti antibiotici vengono selettivamente eliminati dalla cellula batterica per un aumento dell'espressione delle pompe di efflusso MexAB-OprM. Inoltre, la resistenza ai carbapenemi deriva da una perdita di OprD (porine che formano canali all'interno della membrana cellulare accessibili solo ai carbapenemi). Nel nostro studio sono stati analizzati i risultati di antibiotico-resistenza di ceppi di *P. aeruginosa* isolati da emocolture, urine, drenaggi ed esemplari respiratori nel Laboratorio di Microbiologia nel periodo 2000-2005.

Materiali e Metodi. I microrganismi sono stati isolati mediante l'utilizzo di terreno selettivo (Mc Conkey, Biomerieux, Francia), l'identificazione biochimica e l'antibiogramma sono stati eseguiti con sistema automatico (VITEK 2, BioMérieux).

Risultati. Sono stati analizzati per sensibilità a varie classi di antibiotici (chinoloni, aminoglicosidi, carbapenemi, monobattami e cefalosporine) 1062 ceppi di *P. aeruginosa*, isolati da emocolture (6%), urine (7%), drenaggi (4%), esemplari respiratori (21%) e altri materiali (62%). I risultati hanno evidenziato le seguenti sensibilità: aztreonam (47%), ceftazidime (63%), cefepime (48%), imipenem (72%), meropenem (79%), ciprofloxacina (49%), piperacillina/tazobactam (78%), amikacina (69%). L'analisi della sensibilità ai diversi antibiotici in relazione al materiale di provenienza (emocolture, urine, drenaggi, esemplari respiratori) ha evidenziato una più elevata frequenza di ceppi resistenti a cefepime e piperacillina tra quelli isolati da campioni di urine ($P < 0,0001$).

Conclusioni. I risultati confermano la scarsa sensibilità di *P. aeruginosa* verso la maggior parte degli agenti anti-*Pseudomonas* e che la selezione di mutanti resistenti in corso di terapia costituisce un problema clinico importante. In assenza di nuove molecole, la terapia per ceppi resistenti potrà essere basata sull'uso di polimixine nonostante la loro elevata tossicità.

025

SALUTE ORALE E SOGGETTI A RISCHIO DI CARIE

Gatti 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. È noto come la patologia cariosa, pur riconducibile all'azione distruttrice sullo smalto da parte di *S.mutans*, riconosca vari fattori concausali di rilievo tra cui un'alimentazione ricca di zuccheri raffinati, una scarsa igiene orale, un carente apporto, sistemico o locale, di fluoro ed una scarsità di controlli odontoiatrici. Scopo del presente lavoro è stato quello di individuare, tramite l'uso di un test salivare del commercio, soggetti a rischio di carie per poter prevenire, quando possibile, e ridurre nuovi casi di malattia nella popolazione prima che le lesioni si rendano apprezzabili all'esame clinico.

Metodi. Sono stati reclutati 289 pazienti di età compresa tra 20 ed 46 anni, (studenti universitari) con una età media di 22,5 anni. L'analisi era finalizzata alla ricerca di c.f.u./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). Dalle colonie cresciute venivano allestiti vetrini colorati con Gram ed isolamenti su piastre di agar sangue di cavallo (Bioline) ed incubate a 37°C per 48 ore in aerobiosi per gli streptococchi, ed in anaerobiosi per i lattobacilli utilizzando il sistema GENbag (bioMérieux) fino ad ottenere culture 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 289 campioni 205 sono risultati con una carica $< 10^5$ cfu/ml e 84 con carica $> 10^5$ cfu/ml. Per i lattobacilli i risultati sono stati: su 289 campioni studiati: 157 avevano una carica $< 10^5$ cfu/ml e 132 avevano una carica $> 10^5$ 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 indicherebbero che il 29% del campione studiato è ad alto rischio di carie. 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. È chiaro che la promozione della salute implica l'adozione di strategie e di interventi che si collocano non necessariamente entro questo stretto campo sanitario, basti pensare agli interventi di fluorazione delle acque oppure agli interventi sulla grande distribuzione alimentare o sulla pubblicità.

026

TRASMISSIONE DI *HELICOBACTER PYLORI* NEL PERIODO PERINATALE

Monno R.¹, Baldassarre M.E.², Ghezzi F.¹,
Fumarola L.¹, Ierardi E.³

¹Dip. di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Policlinico,
Università degli Studi di Bari,

²Unità di Neonatologia, Università degli Studi di Bari,

³Dip. Scienze Mediche, Università degli Studi di Foggia

Introduzione. Scopo della nostra indagine è stato quello di determinare la possibilità della trasmissione di *H. pylori* da madri infette ai loro neonati.

Metodi. Sono state esaminate 172 donne. L'infezione da *H. pylori* nelle madri fu determinata mediante sierologia, la ricerca dell'antigene di *H. pylori* nelle feci (SAT) e con l'Urea Breath Test (UBT) entro un mese dal parto. L'*H. pylori* status dei neonati fu valutato mediante SAT su campioni di feci ottenuti ai mesi 1, 6, 12, 18.

Risultati. La sierologia per *H. pylori* risultò positiva nel 37 % delle donne esaminate. Il SAT fu eseguito su 62 madri sieropositive e risultò positivo in 58 donne. L'UBT confermò l'infezione in 58 donne. Il SAT fu positivo nel 2.9 % dei neonati (5/172). I 167 neonati negativi al SAT al I mese di vita rimasero negativi fino all'ultimo controllo (18 mesi). Le madri di 3 dei 5 neonati SAT positivi erano risultate negative per *H. pylori*. In 2 di questi 3 neonati il SAT fu positivo solo al I mese di vita e negativo ai successivi controlli; il terzo neonato risultò positivo al SAT al I e al VI mese di vita e negativo ai successivi controlli. Gli altri 2 neonati trovati *H. pylori* positivi con il SAT erano nati da madri positive per *H. pylori*.

Conclusioni. I nostri risultati indicano che la possibilità che madri *H. pylori* positive possano trasmettere l'infezione ai loro neonati nei primi 18 mesi di vita è molto bassa. Inoltre dai nostri studi l'allattamento artificiale e la degenza in terapia intensiva è associata all'infezione da *H. pylori*. Una eradicazione spontanea di *H. pylori* si è verificata in tutti i 5 neonati trovati positivi suggerendo che i neonati sono capaci di eradicare spontaneamente l'infezione e che l'allattamento al seno può contribuire all'eradicazione.

027

2233 COLTURE SU CONGIUNTIVITI DI n.d.d.: INDAGINE EPIDEMIOLOGICA IN 6 ANNI DI OSSERVAZIONE.

Giardini F.¹, Protti R.², Vana M.¹, Grandi G.¹, Pollino C.¹.

¹Laboratorio Analisi ASL I Ospedale Oftalmico Torino

²Divisione Traumatologia ASL I Ospedale Oftalmico Torino

Introduzione. Le congiuntiviti ad eziologia batterica o fungina presentano un esordio monolaterale con iperemia ed essudazione. Solitamente l'occhio adelfo viene interessato in pochi giorni. Il cronicizzarsi della patologia deriva da una non corretta ed appropriata terapia antimicrobica.

Materiali e Metodi. Abbiamo considerato 11074 campioni oculari da pazienti con sindrome congiuntivale di n.d.d. afferiti al nostro Pronto Soccorso o direttamente in Laboratorio tra il 2000 e il 2006. Parte di questi pazienti (29,8%) era già in trattamento antibiotico. Per i campioni oculari giunti dal P.S. sono stati usati i Transport-Cult; per gli altri (circa il 50%) il prelievo è stato eseguito con tamponi di piccolo calibro imbibiti in S. fisiologica sterile e passati nel fornice congiuntivale inferiore, avendo cura di non toccare la rima palpebrale.

Terreni usati: Agar cioccolato (aerobiosi a 37°C. per 48 ore), Agar cioccolato + Bacitracina (capnofilia fino a 48 ore) e brodo cuore-cervello.

Sono state considerate significative anche colture con 1 o 2 colonie, poiché la flora oculare è sempre paucimicrobica.

Risultati. Il significativo numero di casi affrontati dal nostro ospedale monospécialistico rende il lavoro un monitoraggio epidemiologico sulle congiuntiviti, per la nostra area geografica. Si evince che lo *S. aureo* è al primo posto, tra i germi isolati, (622 casi), seguono le Streptococcaceae (412 casi) e lo *S. pneumoniae* (364 casi). Tra i non fermentanti vediamo il gen. *Moraxella* (congiuntiviti angolari, 183 casi), il gen. *Haemophilus* (fascia neonatale e prima infanzia, 51 casi), e il gen. *Pasteurella* (147 casi). Le Pseudomonadaceae (120 casi) sono risultate frequentemente multiresistenti, così come il gen. *Serratia* (83 casi) che supporta congiuntiviti ad andamento clinico invasivo. Ben 774 ceppi presentano resistenza ad almeno 10 antibiotici su 14. I miceti in questa patologia non sono frequenti (18 casi); il gen. *Candida* è presente in 4 casi, mentre con numeri minori sono presenti *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Blastomyces*.

Conclusioni. Dai dati raccolti si evidenzia che circa un paziente su 5, affetto da congiuntivite, presenta coltura positiva. Da qui l'importanza della richiesta dell'esame colturale vista l'alta percentuale di ceppi multiresistenti isolati.

028

ENDOFTALMITI POST-TRAUMATICHE, AD EZIOLOGIA AUTOIMMUNE-INFIAMMATORIA, E SU PORTATORI DI LAC: 21 MESI DI OSSERVAZIONE.

Giardini F.¹, Protti R.², Vana M.¹, Grandi G.¹, Pollino C.¹,
Murisciano R.¹.

¹Laboratorio Analisi ASL I Ospedale Oftalmico Torino

²Divisione Traumatologia ASL I Ospedale Oftalmico Torino

Introduzione. L'endoftalmita post-traumatica è una risposta infiammatoria ad una contaminazione batterica, fungina o virale dell'occhio traumatizzato. La pseudoendoftalmita o uveite anafilattica è un'inflammatione granulomatosa come risposta immunologica verso le proteine del cristallino.

Metodi. Il nostro studio prende in esame 96 casi di endoftalmiti post-traumatiche o ad eziologia autoimmune-inflammatoria e 44 casi di endoftalmiti o ascessi corneali in portatori di LAC (lenti a contatto), tutti afferiti al Pronto Soccorso del ns. Ospedale nell'arco di 21 mesi. Il 10% dei campioni era costituito da prelievi di vitreo trasportati alla Microbiologia del Laboratorio con il sistema Port-a-Cul, dal blocco operatorio. La restante parte era costituita da tamponi Transport-Cult prelevati direttamente sulle lesioni oculari. I materiali sono stati seminati nei flaconi Bactec Ped Plus e Bactec Mycosis ed incubati nella strumentazione Bactec 9050 con protocollo di 7 gg., ed in contemporanea su agar cioccolato (aerobiosi a 37°C per 48 h) e su agar cioccolato con bacitracina (capnofilia a 37°C per 48 h).

Risultati. I 96 pazienti, arruolati in quest'indagine, con endoftalmita post-traumatica o infiammatoria, avevano età media pari a 61,7 anni, mentre i 44 portatori di LAC con endoftalmita o ascesso corneale avevano età media pari a 33,1 anni. Nel 1° gruppo, in 18 casi vi è stata negatività alla coltura su tutti i tipi di terreno. In 4 casi vi è stato sviluppo di flora mista. Dai ns. dati si evince che lo *S. aureus* è il germe più frequente con 19.8%, seguito da *Streptococco* alfa-emolitico, da *S. pneumoniae* e da *Stafilococco* coag. neg., ciascuno con il 12.5%. Il genere *Pseudomonas* con il 10.4%. Di rilievo la presenza con il 14.4% del genere *Candida*, nonché singoli casi di *Alternaria* e *Sporotrichum*. Tra i portatori di LAC si è evidenziata una positività alla coltura del 90.9% con una prevalenza di *Pseudomonas aeruginosa* (32.8%), cui segue lo *S. aureus* al 22.7%.

Conclusioni. L'adozione del sistema Bactec 9050 ci consente di avere elevata positività colturale (78.9%), anche in presenza di pazienti già abbondantemente trattati con pomate e colliri antibiotati, mentre con i terreni colturali solidi tradizionali la positività è di gran lunga inferiore (27.2%) L'elevata positività colturale ottenibile con il sistema Bactec consente di ottenere una maggiore sensibilità nel diagnosticare infezioni oculari ad eziologia batterica e fungina, specie nei portatori di LAC.

029

INDAGINE POLICENTRICA SULLE INFEZIONI DA C. TRACHOMATIS, N. GONORRHOEAE E T. VAGINALIS - DATI PRELIMINARI

Latino M.A., Audisio G., Bongera M., Bordonaro P.,
Bruno A.R., Caola I., Casonato I., Clerici P., Cusini M.,
Fanti D., Fontana C., Garlaschi M.C., Gilardi C., Leone R.,
Mattei R., Modolo M.L., Pauri P., Prignano G., Sensini A.,
Tagliaferro L., Terramocci R.

GLIST (Gruppo di Lavoro sulle infezioni Sessualmente Trasmesse)
Policentrica Sulle Infezioni Sessualmente Trasmesse

Le Infezioni Sessualmente Trasmissibili (IST) sono da annoverare tra le patologie più frequenti al mondo e costituiscono un rilevante problema sanitario sia nei paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo. Facendo riferimento solo a quattro patologie "curabili" L'OMS stima che ogni anno vi siano oltre 340 milioni di nuovi casi di cui la maggior parte nella fascia di età compresa tra i 15 ed i 45 anni. Mentre in molti Paesi l'epidemiologia di tali infezioni è stata ampiamente studiata ed ha permesso di mettere a punto, laddove necessari, programmi di screening e di prevenzione, in Italia ben poco si conosce ancora sulla loro distribuzione.

A tale scopo il Gruppo di Lavoro per le Infezioni Sessualmente Trasmesse (GLIST) sta conducendo un'indagine policentrica per avere indicazioni sulla reale prevalenza di almeno alcune IST ed individuare eventualmente particolari gruppi a rischio.

Metodi. Le informazioni raccolte attraverso una scheda conoscitiva distribuita nel corso del XXXV Congresso Nazionale AMCLI ci hanno permesso di selezionare 21 laboratori di microbiologia caratterizzati da elevati standard clinico-diagnostici e distribuiti sulle tre aree principali del territorio nazionale (Nord, Centro e Sud). Tutti i Laboratori erano caratterizzati da uniformità dei metodi diagnostici: tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAATs) per la diagnosi di infezione da *C. trachomatis*, esame colturale per quelle da *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae*: Ai Laboratori partecipanti è stato fornito un programma compilato in Access per la raccolta dati chiedendo un invio trimestrale al Laboratorio di coordinamento.

Risultati preliminari. Dal 1° gennaio al 31 marzo 2007 sono stati valutati 7.540 pazienti di ambo i sessi di età compresa tra i 14 ed i 70 anni. La prevalenza globale delle infezioni da *C. trachomatis* è risultata pari al 2.4%, quella da *T. vaginalis* 0.9% e da *N. gonorrhoeae* 1.3%. La prevalenza nelle diverse fasce di età è riportata nella tabella seguente.

Età	Donne			Uomini		
	C.t.%	T.v.%	N.g.%	C.t.%	T.v.%	N.g.%
< 25	5.1	2	0.5	7.4	0	10
25-35	1.8	0.6	0.6	5.5	0	5.3
36-45	1.4	0.8	0	5.1	0	4.6
> 45	1.7	2	0.4	1.5	0.6	1.2

Conclusioni. Per quanto sia prematuro trarre conclusioni da questi primi dati raccolti, si può evincere che, in accordo con i dati riportati dalla letteratura internazionale, le fasce d'età maggiormente a rischio d'infezione soprattutto da C.T e N.g sono quelle più giovani per cui sarebbero auspicabili programmi di prevenzione mirati.

030

LA DIAGNOSI DI INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE IN PAZIENTI CON EMOLINFOPATIE MALIGNI: USO DEI TEST IMMUNOLOGICI.

Losi M.¹, Meacci M.², Luppi F.¹, Ferrari A.³, D'Amico R.⁴, Cerri S.¹, Roversi P.¹, Meccugni B.², Marchetti Dori I.², Caracciolo R.¹, Marasca R.³, Luppi M.³, Torelli G.³, Fabbri L.M.¹, Richeldi L.¹, Rumpianesi F.².

¹Sez. Mal. App. Respiratorio, Dip. Mal. App. Respiratorio, Oncologia ed Ematologia, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena;

²Laboratorio di Microbiologia e Virologia,

Azienda Ospedaliera Policlinico Modena, Modena;

³Clinica di Ematologia e ⁴Sez. di Statistica,

Dip. Mal. App. Respiratorio, Oncologia ed Ematologia, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena.

Background. I pazienti affetti da emolinfopatie maligne presentano un aumentato rischio di progressione da infezione tubercolare latente (ITBL) a tubercolosi (TB) attiva dovuto sia alla patologia di base sia a concomitanti trattamenti immunosoppressivi. Il test cutaneo tubercolinico (TCT) presenta una ridotta sensibilità in questi pazienti a causa di una energia cutanea. L'utilizzo dei test basati sulla produzione di interferone-gamma (IFN- γ) dopo stimolazione antigene-specifica potrebbe rappresentare uno strumento diagnostico sia per la diagnosi di ITBL sia di TB attiva in questa popolazione. Scopo dello studio era valutare la sensibilità dei test QuantiFERON-TB Gold-In tube (QFT-G IT, Cellestis, Victoria, Australia) e T-SPOT.TB (TS.TB, Oxford Immunotech, Abingdon, UK) basati sulla produzione "in vitro" di IFN- γ da parte delle cellule-T in risposta alla stimolazione con antigeni micobatterici, ESAT-6 e CFP10, rispetto al TCT in una popolazione di pazienti affetti da emolinfopatia maligna al momento della diagnosi e durante terapia immunosoppressiva.

Metodi. TCT, QFT-G e TS.TB sono stati eseguiti simultaneamente nei pazienti con emolinfopatie maligne al momento della diagnosi e durante la terapia.

Risultati. Sono stati arruolati 93 pazienti (età media 61.3 ± 14.5 anni): alla diagnosi, 10/93 (10.7%), 24/93 (25.8%) e 18/93 (19.4%) pazienti sono risultati positivi rispettivamente con TCT, TS.TB e QFT-G IT. Il test QFT-G IT mostrava un maggior numero di risultati indeterminati (4.3%) rispetto al TS.TB (0%). Durante trattamento immunosoppressivo, 3/42 (7.1%), 7/42 (16.7%) e 5/42 (11.9%) pazienti sono risultati positivi rispettivamente con TCT, TS.TB e QFT-G IT. I test su sangue mostravano un buon livello di concordanza sia al momento della diagnosi ($k=0.57$) sia durante trattamento immunosoppressivo ($k=0.61$).

Conclusioni. Questi risultati indicano che un numero significativo di pazienti con emolinfopatia maligna può avere una ITBL non diagnosticata dal TCT. Inoltre, questi risultati mostrano che i due test su sangue sono minimamente influenzati dal trattamento immunosoppressivo e potrebbero essere proposti come standard diagnostico per la diagnosi di ITBL in questi pazienti.

031

PROTEUS MIRABILIS PRODUTTORE DI CMY-16: UN PROBLEMA EMERGENTE

Sokeng G.¹, D'Andrea M.M.², Brigante G.¹, Giani T.², Mantengoli E.², Pini B.¹, Rossolini G.M.², Luzzaro F.¹

¹Ospedale di Circolo e Università dell'Insubria, Varese;

²Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena.

Introduzione. A differenza delle β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), β -lattamasi acquisite di classe C sono state raramente osservate in *Proteus mirabilis* (che non produce questi enzimi a livello cromosomico). Scopo dello studio è stato quello di analizzare l'evoluzione della resistenza ai β -lattamici in *P. mirabilis* e di caratterizzare i determinanti di tale resistenza.

Metodi. Sono stati studiati 2.070 isolati consecutivi, non duplicati, di *P. mirabilis* ottenuti da pazienti ospedalizzati e ambulatoriali in un periodo di 3 anni (2004-2006). Gli isolati con ridotta sensibilità a cefotaxime e/o ceftazidime sono stati esaminati per la produzione di ESBL mediante test di combinazione con acido clavulanico. La presenza di enzimi di classe C è stata valutata sulla base della ridotta sensibilità alla cefoxitina e confermata con amplificazione genica e sequenziamento diretto.

Risultati. La prevalenza di *P. mirabilis* ESBL-positivi è rimasta costante negli anni 2004, 2005 e 2006 (10.5%, 9.8% e 10.9%, rispettivamente), mentre la prevalenza di isolati produttori di AmpC è aumentata: 0.3% nel 2004, 1.5% nel 2005, 4.6% nel 2006. Tutti gli isolati AmpC-positivi possedevano geni codificanti per la produzione di CMY-16. Oltre ai β -lattamici (con l'eccezione di cefepime e carbapenemi), tali isolati erano comunemente resistenti anche a co-trimoxazolo e ciprofloxacina, mentre mantenevano la sensibilità a piperacillina-tazobactam (MIC ≤ 4 mg/l) e amikacina (MIC ≤ 16 mg/l). La maggior parte degli isolati era associata ad infezioni del tratto urinario in pazienti ospedalizzati, ma ceppi produttori sono stati ottenuti anche da infezioni sistemiche e in pazienti ambulatoriali.

Conclusioni. Negli ultimi anni isolati di *P. mirabilis* produttori di CMY-16 sono rapidamente emersi nella nostra area geografica sia in pazienti ospedalizzati sia in comunità. Questi isolati hanno determinato un marcato incremento della resistenza alle cefalosporine a spettro esteso in *P. mirabilis* e rappresentano un problema emergente che va attentamente monitorato con appropriati metodi di laboratorio.

032

VALUTAZIONE COMPARATIVA DI "ENZYGNOST® SYPHILIS" E "ARCHITECT® SYPHILIS TP" PER LA DIAGNOSI DI SIFILIDE

Marangoni A., Moroni A., Accardo S., Capitani S., Ruscello S., Cevenini R.

Laboratorio di Microbiologia, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna.

Introduzione. La diagnosi di laboratorio di sifilide, basata principalmente sull'utilizzo di indagini sierologiche, riveste un ruolo chiave nella corretta gestione dei pazienti luetici. Nel presente studio sono stati valutati in maniera comparativa i risultati ottenuti da un metodo ELISA in micropiastra, Enzygnost® Syphilis, con quelli ottenuti da un metodo su analizzatore random access, ARCHITECT® Syphilis TP.

Metodi. Gruppo di studio. In totale sono stati analizzati 270 sieri. In particolare, 140 campioni provenivano da pazienti sifilitici, con diversi stadi di malattia. 130 campioni, viceversa, erano stati selezionati dalla routine diagnostica perché avevano dato risultati discordanti tra lo screening, eseguito con ARCHITECT® Syphilis TP, e metodi di conferma.

Test utilizzati. Sono stati utilizzati i seguenti test commerciali: Enzygnost® Syphilis (Dade Behring, Marburg, Germania), ARCHITECT® Syphilis TP (Abbott Japan Co., Tokio, Giappone), TPHA (Alfa Wasserman, Milano, Italia) e RPR (Radim, Pomezia, Italia).

WB. È stato utilizzato un WB allestito con lisato totale di *Treponema pallidum*. Un siero è stato considerato IgG positivo se riconosceva almeno tre delle seguenti quattro bande proteiche: Tp47, TmpA, Tp17 e Tp15.

Risultati. I 140 ottenuti da pazienti sifilitici hanno dato risultati concordanti con i metodi treponemici utilizzati: tutti sono risultati positivi quando testati con Enzygnost® Syphilis, ARCHITECT® Syphilis TP, TPHA e WB. 91/140 sieri erano anche RPR positivi.

I rimanenti 130 sieri hanno dato i seguenti risultati: un siero ha mostrato reattività solo se testato con RPR, ma nessuno degli altri test ha confermato tale positività. Sei sieri sono risultati positivi con ARCHITECT® Syphilis TP ed Enzygnost® Syphilis, ma negativi con WB, TPHA ed RPR. Infine, 122 sieri sono risultati positivi quando testati con ARCHITECT® Syphilis TP e negativi con Enzygnost® Syphilis, TPHA, WB ed RPR.

Conclusioni. Enzygnost® Syphilis ha mostrato una migliore concordanza con TPHA e WB rispetto ad ARCHITECT® Syphilis TP.

033

DIAGNOSI PRECOCE DI SEPSI

Rondinelli V., Focarelli V., Saraceno R., Mazzei U., Colosimo M., Giglio S., Caruso G., Fabiano G., Costa L., Samà S., Masciari R.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio Catanzaro

Introduzione. La sepsi è una risposta infiammatoria sistemica ad un'infezione del torrente circolatorio. Rappresenta la principale causa di decesso nelle terapie intensive non coronariche di tutto il mondo. Abbiamo affiancato alla classica emocoltura metodi diagnostici caratterizzati da tempi di risposta brevi, clinicamente più utili, per una terapia antibiotica adeguata.

Materiali e metodi. Nel mese di ottobre 2006 abbiamo iniziato ad utilizzare per alcuni pazienti della Rianimazione con sospetta sepsi o con alto rischio di evoluzione del quadro clinico e con valori alterati di procalcitonina, il SeptiFast della Roche, un test in PCR real-time su strumento LightCycler in grado di identificare –in sole 6 ore– il DNA di 25 specie batteriche e fungine in campioni di sangue intero in K-EDTA. Sono stati analizzati 54 campioni di pazienti (31 uomini e 23 donne, età media 56 anni) in parallelo alle rispettive emocolture.

Risultati.

SEPTIFAST 6 ore 54 campioni	EMOCOLTURA 54 campioni	Media ore
Klebsiella oxytoca	2	32
Klebsiella pneum.	4	35
Proteus mirabilis	2	39
Pseudomonas aer.	6	94
Acinetobacter baum.	2	92
Staphilococcus aur.	10	43
Enterococcus fecalis	4	56
Staph. coagulasi neg.	8	28
Candida albicans	6	163
Candida glabrata	2	/
Candida parapsilosis	2	172
Nessuna rilevazione	6	/

Conclusioni. La nostra casistica è ancora troppo limitata per consentire valutazioni certe. Possiamo comunque affermare che:

- 1) La tradizionale emocoltura, pur con tutti i noti limiti, non deve essere abbandonata in quanto è l'unica in grado di fornire una terapia specifica;
- 2) Il test Septifast è utile nella pratica clinica per la rapidità della diagnosi;
- 3) Il notevole costo del test Septifast non ne consente un uso routinario per cui si impone una selezione dei pazienti, dopo aver comunque valutato attentamente anche l'onere economico della terapia empirica, spesso inadeguata.

034

VALUTAZIONE DI UN TERRENO COMMERCIALE PER LA RILEVAZIONE DEGLI ENTEROBATTERI ESBL PRODUTTORI

Migliavacca R.¹, Spalla M.², Nucleo E.¹, De Luca C.¹, Caronte I.³, Pagani L.¹

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

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

³Dip. Patologia Animale Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano.

Introduzione. La diffusione di enterobatteri produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) rappresenta un problema di rilevante impatto clinico-terapeutico, inizialmente descritto nelle strutture ospedaliere per acuti e, più recentemente, anche nelle strutture di lungodegenza a carattere riabilitativo e residenze sanitarie assistenziali (RSA).

I test di sensibilità attualmente disponibili, non sempre rilevano correttamente i ceppi ESBL-produttori e richiedono, in generale, test di conferma. Da qui la necessità di valutare nuovi metodi con caratteristiche di semplicità, sensibilità e rapidità utili al rilievo di tali microrganismi.

Scopo del lavoro. Valutare la sensibilità e specificità del terreno cromogeno antibiotato ChromID ESBL (Biomérieux), dedicato allo *screening* dei ceppi ESBL produttori.

Materiali e Metodi. Sono stati testati 81 isolati clinici di enterobatteri ESBL-produttori e non, unitamente a ceppi di *K. pneumoniae* ed *E. coli* di riferimento produttori di β -lattamasi note, singolarmente ed in coltura mista. L'identificazione e la sensibilità agli antibiotici è stata determinata con Vitek 2 System (Biomérieux). Le ESBL sono state caratterizzate con metodi fenotipici e molecolari fino al sequenziamento.

Risultati. sono stati inclusi nello studio enterobatteri produttori delle ESBL di maggiore impatto epidemiologico in Italia, comprese le CBL acquisite.

La lettura delle piastre è stata effettuata valutando i seguenti parametri: aspetto della crescita batterica, colore ed intensità dello stesso mostrati dalle colonie. Tutti i ceppi produttori di ESBL sono risultati positivi alla crescita ed hanno presentato, per ciascuna specie, la colorazione prevista dal terreno ChromID; la sensibilità del test è risultata, quindi, pari al 100%, mentre il valore predittivo positivo è risultato pari al 94%.

Conclusioni. Il terreno ChromID può essere considerato un valido strumento utile per la rapida rilevazione di ceppi di *Enterobacteriaceae* ESBL-produttori in ambito ospedaliero.

035

ENTEROBATTERI PRODUTTORI DI β -LATTAMASI DI CLASSE C ACQUISITE: UN PROBLEMA DIAGNOSTICO EMERGENTE

Migliavacca R.¹, Nucleo E.¹, Arghittu M.², Spalla M.³, Cambieri P.², Caronte I.⁴, Pagani L.¹

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

²Ospedale di circolo "Predabissi-Melegnano", via Pandina, 120070, Milano;

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

⁴Dip. Patologia Animale Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, via Celoria 10, 20133 Milano.

Introduzione. La diffusione di β -lattamasi AmpC plasmid-mediate rappresenta un rilevante problema clinico poiché questi enzimi conferiscono resistenza a tutti gli antibiotici β -lattamici ad eccezione di cefepime, ceftiprome e carbapenemici. In Italia, la diffusione di AmpC acquisite è ad oggi prevalentemente riportata in *P. mirabilis* ed in rari isolati di *E. coli*.

Scopo del lavoro. Valutare, mediante metodi fenotipici e molecolari, la prevalenza di *P. mirabilis* ed *E. coli* AmpC produttori in isolati clinici ESBL positivi.

Metodi. Nel periodo settembre'05-febbraio'07 sono stati raccolti, presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale di Melegnano, 125 isolati consecutivi non replicati ESBL produttori: 44/125 *P. mirabilis* ed 81/125 *E. coli* rispettivamente. Sono stati eseguiti test del doppio disco con piperacillina-tazobactam (TZP), e di conferma CLSI. Per il rilievo degli enzimi AmpC sono stati utilizzati sia metodi fenotipici quali la valutazione della sensibilità alla cefoxitina (FOX) e la positività a test di *screening* (test Hodge, 3D, CAM e con acido borico) che molecolari: PCR con *primer* specifici.

Risultati. Tutti gli isolati sono risultati positivi ai test del doppio disco e di conferma CLSI. 11/81 *E. coli* e 13/44 *P. mirabilis* mostravano I/R a FOX ed elevata resistenza al cefotaxime. I 24/125 isolati sospetti AmpC produttori sono stati sottoposti ad amplificazione: 12/24 (50%), di cui 4/24 *E. coli* ed 8/24 *P. mirabilis*, sono risultati codificare per un enzima appartenente alla linea CMY/LAT. L'Hodge test ha mostrato la maggiore efficienza (70,8%), seguito dai test 3D e CAM (66,6%). La sensibilità dei test di *screening* non è risultata superiore al 58,3%.

Discussione. Il profilo di sensibilità in *P. mirabilis* (sensibilità ad aztreonam, cefepime e TZP e resistenza a cefotaxime e ceftazidime) è indicativo della produzione di AmpC acquisite. In *E. coli*, invece, è sempre necessario ricorrere all'amplificazione genica per distinguere tra iper-produzione ed acquisizione del gene *ampC*. La corretta rivelazione delle AmpC acquisite è di grande rilievo epidemiologico.

036

β-LATTAMASI DI TIPO AMPC ACQUISITE IN *PROTEUS MIRABILIS*: UN FENOMENO IN AUMENTO NELLA PRATICA ASSISTENZIALE

Migliavacca R.¹, Nucleo E.¹, Montani A.³, Vimercati M.³, De Luca C.¹, Spalla M.², Pagani L.¹

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

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

³Presidio Ospedaliero di Codogno, Viale Marconi, I 26845 Lodi

Introduzione. Il predominante meccanismo di resistenza agli antibiotici β-lattamici nei batteri gram negativi è la produzione di β-lattamasi. Il continuo utilizzo delle 7-α-metossi-cefalosporine e l'introduzione in ambito clinico delle combinazioni con inibitori delle β-lattamasi ha causato l'emergere di enzimi di classe C plasmide mediati soprattutto in *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *P.mirabilis* ed *E.coli*.

Scopo del lavoro. Valutare l'incidenza di *P.mirabilis* con ridotta suscettibilità alle cefamicine, produttori di Amp-C acquisite presso il Presidio Ospedaliero di Codogno (Lo).

Metodi. Sono stati raccolti, nei periodi luglio-ottobre '06 e febbraio-maggio '07, un totale di 33 isolati consecutivi non ripetuti di *P.mirabilis* cefoxitina I/R mediante Vitek System. La produzione di Amp-C acquisite è stata evidenziata con il test del doppio disco (DD) usando l'associazione piperacillina-tazobactam (TZP) e confermata mediante PCR con primer specifici.

Risultati. Sia nel primo che nel secondo periodo considerati, si è riscontrata maggiore presenza di *P.mirabilis* cefoxitina I/R nei reparti di medicina (16/33) 48.5% e geriatria (9/33) 27.3%. 25/33 dei ceppi cefoxitina I/R provenivano da campioni di urina di pazienti ospedalizzati. Il numero dei ceppi di *P.mirabilis* cefoxitina I/R è aumentato del 50% nel secondo periodo di studio. I test di sinergia con TZP e cefalosporine di quarta generazione sono risultati sempre positivi, con maggiore resistenza a cefotaxime che a ceftazidime e sensibilità ad aztreonam. L'amplificazione ha confermato la produzione di un enzima appartenente alla linea CMY-LAT in 29/33 isolati.

Conclusioni. La prevalenza di *P.mirabilis* con ridotta suscettibilità alle cefamicine è in preoccupante aumento ed il loro corretto rilievo risulta tanto importante quanto problematico. I sistemi automatizzati non permettono di rilevare la produzione di tali enzimi. Per un corretto approccio diagnostico si può prevedere l'allestimento di test di sinergia con TZP, cefalosporine di quarta generazione ed aztreonam.

037

TUBERCOLOSI MULTIRESISTENTE: DUE CASI CLINICI

Nisticò S., Potente G.I., Leone R.A., Minchella P., Borelli A., Caruso V., Piccoli S., Carlei M.I., Caruso D., Camerino M., Folino C., Piccoli M., Cerminara M.T., Mustaro C., Gagliardi B., Sacco I., Nicolazzo A., Quintieri F*, Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, Presidio Ospedaliero, via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

* U.O. Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio di Catanzaro.

Introduzione. L'infezione da Micobatteri tubercolari (8-9 milioni di nuovi casi all'anno nel mondo, dati 2004) è la seconda causa di morte per malattie infettive (4% di tutte le morti). Oltre all'aumento di incidenza dell'infezione, desta particolare preoccupazione l'insorgenza sempre più frequente di ceppi batterici resistenti ai farmaci impiegati nella terapia.

Casi clinici. Paziente di 23 anni, extracomunitario (Marocco) con tosse produttiva, febbre e astenia (**PZ1**). Paziente italiano di 60 anni, con pregressa diagnosi di tubercolosi polmonare, trattato con terapia antibiotica classica, ma senza miglioramento del quadro clinico (**PZ2**). I campioni di escreato di entrambi i pazienti sono stati sottoposti ad esame batterioscopico (colorazione di Zihel-Neelsen), ad esame colturale (Bactec MGIT960) ed a ricerca del genoma di *Micobacterium tuberculosis* complex (Probetec ET). Tutti gli esami hanno dato esito positivo. Gli antibiogrammi sono stati eseguiti dalla coltura primaria con il sistema Bactec MGIT 960 che determina la sensibilità o resistenza dei ceppi in esame nei confronti degli antibiotici Streptomycin, Isoniazide, Rifampicina, Etambutolo e Pirazinamide a due diverse concentrazioni. Si sono ottenuti i seguenti risultati: antibiogramma PZ1: resistenza, ad esclusione di Pirazinamide, a tutti i farmaci e con le diverse concentrazioni; antibiogramma PZ2: resistenza a tutti i farmaci ad esclusione di Pirazinamide e di Streptomycin al dosaggio più alto.

Conclusioni. Il sospetto clinico di malattia tubercolare deve essere sempre suffragato dalla diagnosi etiologica da effettuare nel più breve tempo possibile. I tests di sensibilità agli antibiotici, convenzionalmente utilizzati per la terapia, vanno sempre eseguiti. E' pertanto opportuno che i laboratori di livello I inviino le colture primarie ad un centro di riferimento.

038

SINDROME EMOLITICO UREMICA (SEU) IN ITALIA E INFEZIONI DA E.COLI PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINA (VTEC): 20 ANNI DI SORVEGLIANZA

Minelli F.¹, Scavia G.¹, Escher M.¹, Fioravanti A.¹, Marziano M.L.¹, Morabito S.¹, Tozzoli R.¹, Brigotti M.², Ferretti A.³, Pecoraro C.³, Caprioli A.¹ e i centri di Nefrologia Pediatrica aderenti al Registro Nazionale della SEU Pediatrica*.

¹ Istituto Superiore di Sanità, Roma;

² Università di Bologna;

³ Ospedale Pediatrico Santobono, Napoli.

La SEU rappresenta la manifestazione clinica più caratteristica e grave delle infezioni da VTEC. Per questo motivo, essa può essere considerata un indice attendibile dell'incidenza totale di queste infezioni in una popolazione.

In Italia un sistema di sorveglianza nazionale della SEU in età pediatrica è stato stabilito nel 1988. Da ogni paziente vengono raccolti dati clinico-epidemiologici e campioni di feci e siero per la diagnosi di laboratorio dell'infezione da VTEC. Questa è basata su:

- i) esame delle feci per l'isolamento dei VTEC e l'identificazione della VT libera;
- ii) l'identificazione di anticorpi serici diretti contro il lipopolisaccaride (antigene O) dei principali sierogruppi VTEC (O157, O26, O103, O111, O145);
- iii) l'identificazione mediante fluoro-citometria della VT legata ai leucociti polimorfonucleati circolanti (PMN).

Durante il periodo 1988-2007 sono stati notificati 561 casi, con un'incidenza media annua di 0.3×10^5 nella fascia di età 0-15 anni. Campioni biologici sono stati raccolti da 434 casi ed evidenze di infezione da VTEC sono state ottenute in 291 di questi (67%). In particolare, VTEC sono stati isolati da 39 casi, VT libera è stata identificata in 96 campioni, anticorpi anti-LPS in 242 dei 278 sieri esaminati (88%) e 18 sono risultati positivi per la VT legata ai PMN.

Il sierogruppo VTEC più frequentemente associato alla SEU è stato O157, identificato nel 29,9% dei casi VTEC-positivi, seguito da O26 (24%), O145 (13%), e O111 (8,9%). Durante il periodo 1997-2007, tuttavia, si è assistito ad un aumento dei casi associati a infezione da VTEC O26, il cui numero ha superato quello dei casi associati a infezione da VTEC O157.

039

CLOSTRIDIUM DIFFICILE: L'ESAME CULTURALE E LA RICERCA DELLE TOSSINE NEL MANAGEMENT CLINICO

Agus P., Lorenzetti P., Montanera P.G.

USL della Valle d'Aosta. Struttura Complessa Laboratorio di Microbiologia. Via Guido Rey, 5 11100 Aosta.

Introduzione. Diversi antibiotici possono alterare l'equilibrio della normale flora batterica intestinale e permettere una crescita massiva di *C. difficile*, un bacillo anaerobio gram +. La colonizzazione si verifica per via orofecale attraverso l'ingestione di spore resistenti al calore, che persistono nell'ambiente per un lungo periodo e sono specialmente prevalenti nei luoghi di assistenza sanitaria (p. es., ospedali, lungodegenze). La diarrea e la colite sono causate dalle tossine prodotte dai ceppi patogeni di *C. difficile*. Risulta pertanto di estrema importanza la gestione dei dati e delle informazioni che il Laboratorio può fornire al clinico, non soltanto sulla presenza o meno del batterio, quanto sulla tossinogenicità del ceppo isolato. Inoltre è da tenere in particolare conto la velocità con la quale il Laboratorio è in grado di dare indicazioni al Clinico, in particolare sulla presenza o meno di tossina enteropatogena.

Metodi. Dal momento della introduzione in routine della ricerca delle tossine con metodo immunoenzimatico rapido della Ditta Meridian, ci si è posti il problema di correlare i risultati negativi con il risultato della coltura; si è deciso comunque di coltivare anche i campioni negativi alla ricerca veloce.

Sono stati analizzati circa 80 campioni provenienti sia da Reparti ospedalieri sia da pazienti ambulatoriali; la ricerca della tossina ha dato 65 risultati negativi che sono stati trattati con semina in terreno selettivo CLO Biomerieux in anaerobiosi a 37° per 48 ore; l'eventuale crescita, dopo conferma al Gram, viene inoculata in Hemoline ANA-F Biomerieux per 48 h e poi nuovamente testato per la presenza di tossina. Di questi campioni uno è risultato positivo alla coltura ed alla successiva ricerca della Tossina

Conclusioni. L'esame culturale, pur nella sua delicatezza, si conferma Metodica di Riferimento per la ricerca del *Clostridium Difficile*, in particolare in quei casi in cui la ricerca diretta della Tossina abbia dato risultato negativo. La ricerca rapida della tossina si conferma un utilissimo ausilio clinico nei casi di positività in particolare rispetto ai tempi di esecuzione e refertazione. Rimane ancora da approfondire la problematica, sollevata da alcuni Centri, sulla necessità di effettuare la ricerca diretta obbligatoriamente in due momenti successivi per ovviare alla eventuale presenza di tossina in quantità inferiori alla soglia di sensibilità del metodo: a nostro avviso, comunque, i risultati più attendibili si ottengono con l'esame culturale correttamente condotto.

040

VALUTAZIONE DI DUE TEST (URI A.R. TEST STRIP E PAR TEST - DIESSE) PER LA RILEVAZIONE DEL POTERE ANTIMICROBICO RESIDUO (PAR) NELLE URINE

Pescetto L., Bandettini R., Morelli P., Gatti C., Formiga A., Fenu L., Ferrari P., Pellettieri A., Ricagni L.

Laboratorio Centrale di Analisi, Ist. G. Gaslini, Genova

Introduzione. La presenza nelle urine di antibiotici o altre sostanze inibenti la crescita batterica può alterare l'esito dell'urinocoltura.

Materiale e Metodi. In questo studio sono stati confrontati due test (DIESSE) per la rilevazione del Potere Antimicrobico Residuo (PAR) nelle urine: uno in completa automazione URI A.R. TEST STRIP e l'altro manuale PAR TEST.

Il primo test si esegue contemporaneamente all'urinocoltura nello strumento Robobact. E' costituito da strisce reattive su cui sono essiccate spore di *Bacillus subtilis*. Dopo l'incubazione viene valutato l'esito:

- Una macchia rossa indica sviluppo batterico quindi assenza di sostanze antibatteriche nel campione di urina (risultato negativo);
- L'assenza di colore rosso indica la presenza di sostanze antibatteriche nel campione (risultato positivo)

Il secondo test (PAR TEST) è costituito da piastre con 48 pozzetti, ciascuno dei quali contenenti spore di *Bacillus subtilis*. Dopo inoculazione e incubazione viene letto il risultato valutando il colore di ciascun pozzetto:

- color giallo: positivo
- color rosso vinaccia: negativo.

Con questi test sono state saggiate 240 urine di pazienti in età pediatrica per i quali oltre l'urinocoltura è stato richiesto anche il PAR test.

Risultati. Dei 240 campioni di urina saggiati con i due test a confronto si sono ottenuti i seguenti risultati:

- 234 (97,5%) concordanti (64 (26,7%) concordanti positivi - 170 (70,8%) concordanti negativi)
- 6 (2,5%) discordanti (3 URI A.R. TEST STRIP positivi / PAR TEST negativi - 3 URI A.R. TEST STRIP negativi / PAR TEST positivi)
- χ^2 di McNemar: p non significativo

Discussione. Con il sistema URI A.R. TEST STRIP si ha:

- riduzione dei tempi di allestimento del campione
- qualità pre-analitica migliore
- sistema automatico
- sistema chiuso

I test confrontati in questo lavoro hanno mostrato un'ottima concordanza (97,5%) contro una discordanza pari al 2,5% e nessuna differenza statisticamente significativa.

041

SENSIBILITÀ DI *Pseudomonas aeruginosa* A CIPROFLOXACINA NELL'OTITE MEDIA PURULENTA

Nisticò S., Potente G.I., Leone R.A., Minchella P., Borelli A., Caruso V., Piccioli S., Carlei M.I., Caruso D., Camerino M., Folino C., Piccoli M., Cerminara M.T., Mustaro C., Gagliardi B., Sacco I., Nicolazzo A., Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, Presidio Ospedaliero, via Perugini, 88046 Lamezia Terme) (CZ)

Introduzione. Le infezioni dell'orecchio medio sono sostenute da diversi microrganismi: tra i più comuni *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, maggiore rappresentante dei germi ossidasi positivi. La necessità, sempre più frequente, di superare forme di resistenza ai farmaci, dimostrate soprattutto da *P. aeruginosa*, induce spesso all'utilizzo di nuovi antibiotici; attualmente è ampiamente diffuso l'uso dei fluorochinoloni, soprattutto della Ciprofloxacina.

Scopo del lavoro. Verificare la sensibilità alla Ciprofloxacina di ceppi di *P. aeruginosa*, isolati da tamponi auricolari, per giustificare il frequente ricorso a tale antibiotico nella terapia delle otiti medie purulente.

Materiali e metodi. Tamponi auricolari di pazienti ricoverati ed ambulatoriali con evidenza clinica di otite media purulenta afferenti alla nostra U.O. nell'anno 2006. I tamponi sono stati processati su agar sangue Columbia montone (Becton Dickinson), agar Sabouraud ed agar MacConkey (Kima); la lettura delle piastre è stata effettuata dopo 24-48 h. Dalle colture primarie e/o dalle subculture è stata eseguita l'identificazione biochimica ed il saggio di sensibilità agli antibiotici con il sistema Vitek 2 (Bio-Merieux).

Risultati. Su n° 115 tamponi auricolari positivi per germi patogeni, n° 50 sono risultati positivi per la ricerca di *P. aeruginosa*; di questi, solo in un campione è stato isolato un ceppo resistente alla Ciprofloxacina.

Discussione e conclusioni. I nostri dati, seppur limitati, hanno dimostrato una bassa percentuale di resistenza (2%) alla Ciprofloxacina dei ceppi di *P. aeruginosa* isolati e confermano, quindi, la validità di Ciprofloxacina come farmaco di prima scelta per le infezioni auricolari sostenute da tale germe. L'utilizzo dei fluorochinoloni, inoltre, ha il vantaggio di non richiedere somministrazioni parenterali e di essere una terapia a bassa incidenza di effetti collaterali.

042

STREPTOCOCCUS agalactiae: PREVALENZA IN UNA POPOLAZIONE DI GRAVIDE

Piccioli S., Caruso V., Leone R.A., Minchella P., Nisticò S., Potente G.I., Borelli A., Carlei M.I., Caruso D., Camerino M., Piccoli M., Cerminara M.T., Mustaro C., Gagliardi B., Sacco I., Nicolazzo A., Luciano A.

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

Introduzione. Lo Streptococco β emolitico di gruppo B di Lancefield o *Streptococcus agalactiae* (GBS), risulta essere responsabile di gravi infezioni neonatali con due diversi quadri clinici:

- a) infezioni precoci come sepsi, meningiti, polmoniti;
- b) infezioni tardive come otiti, osteomieliti, meningiti.

La donna portatrice di GBS trasmette il microrganismo al neonato in fase prenatale per via ascendente o in fase di passaggio nel canale vaginale, al momento del parto. È stato osservato che la profilassi attuata sulle donne portatrici, sia in gravidanza che addirittura in fase intrapartum, riduce sensibilmente le infezioni neonatali. Lo scopo del nostro lavoro è stato di rilevare la prevalenza di GBS su campioni vaginali e rettali di pazienti gravide tra la 35^a e la 37^a settimana di gravidanza nell'arco di un anno.

Materiali e Metodi. Nell'anno 2006 sono state sottoposte a prelievo, mediante tampone vaginale e rettale, n. 642 gestanti di età compresa tra i 26 e i 37 anni. Lo GBS è stato ricercato utilizzando il sistema Istant Granada Medium, terreno liofilo in tubo con metotrexate, agente selettivo potenziante il pigmento carotenoidale che le colonie di GBS producono spontaneamente, prodotto da Biomedic distribuito da Alifax. I terreni sono stati incubati a 37° C per 18 ore, osservando la presenza di colonie di colore arancione, indice di positività. I tubi negativi sono stati reincubati fino a 48 ore.

Risultati. Sono risultate positive alla ricerca di GBS n. 163 (25,4 %) gravide, mentre n. 479 (74,6 %) sono risultate negative. Il totale delle positività per tipologia di campione è il seguente: n. 56 (34,3 %) per il tampone vaginale, n. 13 (8,0 %) per il tampone rettale e n. 94 (57,7 %) per entrambi i tamponi.

Conclusioni. La percentuale di positività riscontrata (25,4 %) è superiore ai dati osservati in altri paesi europei (10-20 %). Inoltre, considerando il numero di parti avvenuti nel periodo in osservazione, che è stato di 850, si evince che 208 gestanti (24,5 %) non sono state sottoposte a screening. Data l'alta percentuale di gestanti risultate positive e di gestanti non incluse nello screening, riteniamo che sia necessaria una maggiore sensibilizzazione e informazione alle gravide sull'importanza di questo test.

043

TIPIZZAZIONE DI CEPPI DI STREPTOCOCCUS PYOGENES emm77 ISOLATI DA DIFFERENTI CAMPIONI CLINICI

Palmieri¹ C., Princivalli M.S.¹, Baldassarri L.², Creti R.², Varaldo P.E.¹, Facinelli B.¹

¹Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche, Ancona;

²Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione. L'analisi di popolazione di ceppi di *Streptococcus pyogenes* isolati nel corso di due Programmi di sorveglianza nazionale in Italia e Norvegia (ARTEMIS-1997/98; NORM-2002) ha evidenziato la diffusione clonale di ceppi *emm77*, resistenti a macrolidi e tetracicline [*erm(A)/iMLS-B tet(O)*] ed in grado di invadere cellule respiratorie (*prtF1*-positivi), appartenenti al *Clonal Complex* (CC) ST63/369. Il successo di ST63/369 può essere spiegato sia dal tipo *emm* che dalla associazione resistenza/invasività: maggiore capacità di colonizzazione (nessuna preferenza di *emm77* per il sito di infezione), capacità di sfuggire ai β -lattamici (localizzazione intracellulare) ed ai macrolidi (resistenza). In questo studio, sono stati tipizzati ceppi *emm77*, isolati in Italia nel 2003-2005.

Metodi. 10 isolati *emm77*: faringe (6), sangue (2), ferita (1), *toxic shock syndrome* (TSS) (1), comprendenti nove ceppi *erm(A)/iMLS-B tet(O)* ed un ceppo *tet(M)*. I ceppi sono stati sottoposti a PFGE, MLST e *RD2*-typing. SP1900 (ST63/369) veniva utilizzato come controllo.

Risultati. Il pulsotipo differiva dal controllo per 2-3 bande in tutti i ceppi faringei, in un ceppo da sangue e nel ceppo da ferita, mentre differiva di 5-6 bande nei restanti ceppi. Tutti i ceppi *erm(A)/iMLS-B, tet(O)* appartenevano a ST63/369 e presentavano *RD2*-type d, mentre il ceppo *tet(M)* apparteneva a ST35/399 e presentava un tipo *RD2* non ancora descritto.

Conclusioni. I risultati della PFGE suggeriscono una stretta correlazione tra loro e con il clone ST63/369 dei ceppi faringei, di uno dei ceppi isolati da sangue e di quello da ferita ed una possibile correlazione del ceppo isolato da TSS e del ceppo da sangue sensibile ai macrolidi. I risultati di MLST dimostrano che tutti i ceppi *erm(A)/iMLS-B tet(O)* appartengono al CC ST63/369, e che il ceppo *tet(M)* appartiene ad un diverso CC. Tali risultati evidenziano la persistenza nel tempo di ST63/369 in ceppi faringei e documentano la sua presenza in ceppi invasivi.

044

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IN ITALIA: CLONI CIRCOLANTI DI CEPPI NON VACCINALI ANTIBIOTICO-RESISTENTI

Pantosti A.¹, Gherardi G.², Monaco M.¹, Camilli R.¹,
D'Ambrosio F.¹, Del Grosso M.¹, D'Ancona P.¹,
Manganelli R.³, Dicuonzo G.²

¹Istituto Superiore di Sanità, Roma

²Università Campus Bio-Medico, Roma.

³Università di Padova, Padova.

Introduzione. Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare i cloni di pneumococco antibiotico-resistenti appartenenti a sierotipi non inclusi nel vaccino glicoconiugato eptavalente (PCV7), circolanti in Italia prima e dopo l'introduzione del vaccino.

Metodi. Sono stati sierotipizzati pneumococchi invasivi isolati in Italia sia da adulti che da bambini. Le prove di sensibilità agli antibiotici sono state effettuate mediante E-test. I profili di Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e la Multilocus Sequence Typing (MLST) sono stati usati per identificare i gruppi clonali.

Risultati. Nel periodo 1999-2003, circa il 50% degli isolati dalla popolazione generale apparteneva a sierotipi non vaccinali. Tra questi, il 4,6% erano penicillina-non sensibili (PNSSP), tutti nella categoria intermedia. Il 13,9% erano sensibili alla penicillina, ma resistenti a eritromicina, clindamicina e tetraciclina (MDR-PSSP). Tra i PNSSP, i sierotipi prevalenti erano il 19A e il 35F (5 isolati ciascuno). Tra i MDR-PSSP i sierotipi prevalenti erano il 19A (14 isolati), 15B/C (11 isolati), e 3 (8 isolati). Tra i PNSSP sono stati identificati i cloni internazionali Sweden^{15A}-25/ST63 e Denmark¹⁴-32/ST230, e i nuovi cloni ST676 e ST675. Tra i MDR-PSSP sono stati identificati i cloni Netherlands^{15B}-37/ST199, Greece²¹-30/ST193, e Netherlands³-31/ST180, ed il nuovo clone ST1577.

Conclusioni. In era pre-vaccinale in Italia i sierotipi non inclusi nel PCV7 mostravano un basso grado di resistenza alla penicillina e mutiresistenza rispetto ai sierotipi vaccinali (PNSSP: 4,6% contro il 16,4%; MDR-PSSP: 13,9% contro il 38,2%). Sono stati identificati sia cloni internazionali che nuovi cloni. Risultati preliminari sulla distribuzione dei sierotipi di pneumococchi raccolti nel 2006-2007 evidenziano un aumento dei ceppi PNSSP appartenenti al sierotipo 19A, il sierotipo non vaccinale che negli Stati Uniti è aumentato drammaticamente in seguito all'introduzione del PCV-7.

045

SU UN NUOVO TEST ELISA PER LO SCREENING DELLA LUE

Panuccio A., Bellasio A., Biagiola P., Lazzaro E., Marrone A., Pasquali D.

Laboratorio Sanità Pubblica - Milano

I test per lo screening della sifilide si arricchiscono sempre più di metodiche che riescono a coniugare rapidità e maneggevolezza, anche intesa come possibilità di automazione, con elevati standard qualitativi riferibili a sensibilità e specificità. Nell'ultimo decennio abbiamo assistito ad una forte pressione all'introduzione di metodiche ELISA, che permettano di soddisfare i punti sopra esposti. Abbiamo pertanto provato un nuovo metodo Elisa microtiter (Eiagen, Syphilis New Generation, Adaltis) che utilizza in fase solida antigeni da ricombinante.

Per le prove di specificità ci siamo avvalsi di 450 sieri routinari che erano risultati negativi al test di screening in uso. Dei 450 sieri esaminati solo 2 campioni sono risultati positivi e pertanto abbiamo provveduto a processarli con i test in uso nel nostro laboratorio.

Succintamente, VDRL TPPA ed FTA sono risultati negativi per entrambi i campioni e mentre per il primo campione, di cui non disponevamo di rilievi anamnestici-clinici, il risultato dell'immunoblotting è da considerarsi indeterminato (15 ±, 17+, 44.5±, 47±).

Al contrario, il secondo campione è risultato, in maniera inaspettata, francamente positivo alle quattro bande. Non ci è dato conoscere per il momento la causa di un risultato così inatteso su un soggetto a rischio che effettivamente aveva presentato due anni prima delle lesioni primarie ai genitali. Avendo la possibilità di testare il campione (congelato a -20°C) inviatoci all'epoca (2 anni prima), abbiamo avuto il riscontro del medesimo quadro sierologico ossia positività netta alla Western blot e restante quadro silente.

Per le prove di sensibilità ci siamo avvalsi di 102 campioni in routine e di 79 sieri congelati a -20°C di cui era noto il quadro sierologico completo di IgM specifiche e lo stadio della malattia: 32 casi di lue primaria 13 di lue secondaria 10 di lue latente recente 23 di lue latente tardiva ed un caso di lue connatale.

Solo in un caso estratto della routine (VDRL: neg., TPPA: pos.) abbiamo verificato una risposta parziale ma qualunque insufficiente, stagliandosi sotto il cut off (DO/CO=0,7).

In conclusione, le prove eseguite hanno reso evidente l'ottima specificità (100%) e la elevata sensibilità del kit in esame, in particolare nello stadio primo-secondario della malattia e pertanto in ragione delle eccellenti performances rivelate in termini di attendibilità, non disgiunte dalla rapidità d'esecuzione, dall'estrema maneggevolezza per la completa automazione, dal veramente trascurabile numero di casi in zona grigia, qualità rappresentanti gli elementi significativi e portanti di un test di screening, si può affermare che ha superato brillantemente le prove a cui è stato sottoposto.

046

VALUTAZIONE DI UN TEST DI AGGLUTINAZIONE AL LATTICE PER L'IDENTIFICAZIONE DI *S. AUREUS*

Maggi T.¹, Parigi R.¹, Brignali S.², Meacci F.²¹Sclavo Diagnostics International S.R.L.

Loc. Pian Dei Mori, 53018

²LAMMB, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, 53100 Siena

Introduzione. Una delle metodiche di cui si avvale la diagnostica di laboratorio per l'identificazione di *Staphylococcus aureus* è basata sull'utilizzo di test rapidi di agglutinazione. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la sensibilità e la specificità del test di agglutinazione al lattice Staphylorapid (Sclavo Diagnostics) per l'identificazione di *S. aureus*.

Metodi. Sono stati utilizzati 76 ceppi di *S. aureus* di provenienza clinica, di cui 38 sensibili alla meticillina (MSSA) e 38 resistenti alla meticillina. Come controlli sono stati utilizzati ceppi della collezione ATCC di stafilococchi coagulasi-negativi, di streptococchi beta-emolitici e di enterococchi. I risultati ottenuti mediante il test Staphylorapid (Sclavo Diagnostics) sono stati confrontati con quelli ottenuti con un test analogo (Staphaurex, Remel).

Risultati. Il test Staphylorapid ha dimostrato di essere specifico per lo *S. aureus* e di avere una sensibilità del 97,3%, poichè non è stato in grado di identificare due ceppi MRSA. Questo risultato è stato confermato anche con il kit Staphaurex. È da notare che per il 93% dei ceppi identificati la reazione di agglutinazione è risultata positiva entro 5 secondi, mentre per 4 ceppi la positività è stata rilevata dopo 1 minuto. L'identità di specie dei due ceppi MRSA risultati negativi all'agglutinazione è stata confermata mediante sequenza del 16S rDNA.

Conclusioni. Staphylorapid è un test accurato, di rapida esecuzione e rilevazione che garantisce un'ottima sensibilità e specificità sia verso ceppi MSSA che MRSA.

047

DIAGNOSI IMMUNOLOGICA DELLE INFEZIONI TUBERCOLARI

Pasanisi G.¹, Maggio G.¹, Turco D.¹, Quattrocchi M.¹, Barone P.², Lobreglio G.¹¹UOC Medicina di Laboratorio,²UOC Pneumologia A.O. "Card. G. Panico" Tricase (Lecce)

Introduzione. L'esito di una infezione tubercolare, ampiamente evidenziato dalla risposta immunitaria, può variare dalla condizione di infezione latente alle gravi manifestazioni cliniche respiratorie o multistessutali. Analisi genomiche hanno permesso l'identificazione di proteine specifiche del *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10), ma assenti nel *M. bovis* e nei non tubercolari. L'impiego di tali proteine *in vitro* permette di rilevare la presenza di linfociti T circolanti a seguito della specifica stimolazione. Il presente ha la finalità di stabilire le eventuali infezioni latenti in alcune categorie.

Metodi. Sono stati presi in considerazione 96 campioni di sangue da soggetti con sospetto clinico, esposizione professionale, per terapia immunosoppressiva anti-TNF-alfa, contestualmente alla intradermoreazione secondo Mantoux ma ripetutamente negative le ricerche batteriologica e molecolare. Il saggio per linfociti T effettori è stato condotto mediante T-SPOT TB (Oxford Immunotec).

Risultati. Tra il personale sanitario senza vaccinazione documentabile sono stati identificati dalla intradermoreazione (21-22 mm) e dal test *in vitro* 2 soggetti (3,8%), uno con anamnesi per tubercolosi. Tra i 21 soggetti con documentata vaccinazione 12 (57,1%) conservavano una cutireattività (7-20 mm), ma negativi al saggio *in vitro*.

Tra i 25 pazienti cutireattivi (7-18 mm) destinati al trattamento immunosoppressivo, 1 caso (4%) di positività al test *in vitro*. Nei 19 casi di sospetto clinico, per infezione tubercolare la positività per entrambe le valutazioni immunologiche è stata evidenziata in 5 (26,3%) con diametro alla intradermoreazione pari al 15-30 mm. La cutireattività da sola è stata segnalata solo in 4 casi (21,0%).

Conclusioni. Alla luce dei recenti indirizzi dell'OMS riguardo alle forme tubercolari latenti i metodi immunologici evidenziano un elevato potenziale diagnostico. Con particolare riferimento alle indagini *in vitro* da noi effettuate, è stato possibile individuare 2 casi tra il personale sanitario e 6 casi tra i pazienti che con molta probabilità avrebbero avuto un prolungato monitoraggio clinico.

048

INFLUENZA DELLA ANTIBIOTICOTERAPIA SUL DIFFERENTIAL TIME TO POSITIVITY (DTP) NELLE BATTERIEMIE CVC-CORRELATE

Passerini R., Moretti L., Riggio D., Urso V., Sandri M.T.

Divisione di Medicina di Laboratorio
Istituto Europeo di Oncologia - Milano

Nella diagnosi delle batteriemie CVC correlate il DTP, secondo dati della letteratura, presenta una importante diminuzione della specificità in corso di antibioticotera-

pia. In questo studio abbiamo analizzato i nostri dati per valutare se vi sia correlazione tra il Tempo di Positivizzazione (TP) e il germe isolato, tra il TP e la antibioticotera-

pia e infine se vi siano differenze fra pazienti immunocompromessi e immunocompetenti. Dal 2002 al 2007 abbiamo processato 6682 emocolture; 1219 sono risultate positive, 743 per Gram positivi, 402 per Gram negativi e 74 per miceti, anaerobi e isolamenti misti.

Fra le 1145 emocolture positive per aerobi, il TP mediano dei Gram negativi (650 minuti, range 60-7090) è risultato significativamente inferiore (Wilcoxon) rispetto a quello dei Gram positivi (1152.5 minuti, range 70-7230).

In 680 delle emocolture positive era noto se il paziente fosse in terapia antibiotica: nelle 211 in assenza di terapia il TP mediano (818.57minuti, range 60- 6910) è risultato complessivamente inferiore a quello delle 469 dei pazienti in terapia (1095.00 minuti, range 40-7090), con una differenza maggiore nei prelievi da CVC rispetto a quelli periferici. Una ulteriore subanalisi ha evidenziato che la terapia non influenzava significativamente il TP dei Gram negativi, mentre lo allungava sensibilmente nei Gram positivi.

Fra pazienti chirurgici e oncologici ci sono differenze significative sia relativamente ai TP mediani in generale (875.00 versus 1044.33), sia distinguendo Gram positivi da Gram negativi, che terapia da assenza di terapia; l'analisi statistica su ognuna delle due popolazioni ha confermato un andamento analogo nei tre gruppi, pazienti chirurgici - oncologici - totalità della popolazione. Concludendo, in corso di terapia le batteriemie da Gram positivi presentano un aumento del TP, sia nei campioni da prelievo centrale che periferico, con una potenziale interferenza sui DTP; quelle da Gram negativi il TP non sembra invece essere influenzato, conservando il significato diagnostico del DTP.

049

SPIROCHETOSI INTESTINALE UMANA ASSOCIATA A LESIONI CANCEROSE E DISPLASTICHE DELLA MUCOSA DEL COLON.

Calderaro A.¹, Peruzzi S.¹, Gorrini C.¹, Piccolo G.¹, Villanacci V.², Missale G.³, Dettori G.¹, Chezzi C.¹

¹Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma

²Dipartimento di Patologia Spedali Civili, Università di Brescia

³Unità di Endoscopia, Spedali Civili, Università di Brescia.

Introduzione. È stato ipotizzato che *B. aalborgi* e *B. pilosicoli*, agenti causali di Spirochetosi Intestinale umana (SI), non siano capaci di colonizzare l'epitelio di polipi colici iperplastici ed adenomatosi. Tuttavia, la loro presenza a livello di queste lesioni è stata riportata in letteratura ed è stata dimostrata nella mucosa circostante lesioni carcinomatose del colon ma non sulle cellule neoplastiche.

Metodi. Nel 1998, dopo la diagnosi di adenocarcinoma del sigma, una donna Italiana di 43 anni è stata sottoposta ad emicolectomia sinistra. In seguito, la paziente è stata sottoposta annualmente a colonscopia di controllo e nel gennaio 2007 alcune biopsie sono state saggiate mediante indagini microbiologiche (coltura e 16S rDNA RFLP PCR) per diagnosi di SI.

Risultati. Dopo il riscontro di spirochete nelle biopsie del 2006 e 2007, il patologo ha deciso di cercare la loro presenza anche nei campioni prelevati durante le precedenti endoscopie. Spirochete intestinali sono state trovate nelle biopsie prelevate durante l'intervento nel 1998, adese alle cellule epiteliali normali ma non a quelle del carcinoma. Inoltre, sono state osservate sull'epitelio di un polipo iperplastico nel 2001 e di un adenoma tubulare nel 2006. Nel 2007, dopo l'ultima colonscopia, alcune biopsie ed un campione di feci sono stati inviati al nostro laboratorio per la diagnosi microbiologica di SI. L'esame colturale ha dato esito negativo su entrambi i materiali, mentre la RFLP-PCR ha rivelato la presenza di *B. pilosicoli* nelle biopsie ma non nelle feci.

Conclusioni. Questo caso suggerisce che le spirochete intestinali siano capaci di colonizzare l'epitelio colico iperplastico e displastico ma non quello neoplastico. È rilevante che la loro presenza sia stata dimostrata dalle indagini microbiologiche, in tutte le biopsie ottenute nel corso di 8 anni: è possibile ipotizzare un'infezione cronica oppure una re-infezione, tenendo conto che la paziente non è mai stata sottoposta a terapia specifica (metronidazolo).

050

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTI-BATTERICA "IN VITRO" DELL'ULIFLOXACINA NEI CONFRONTI DEI PRINCIPALI BATTERI GRAM NEGATIVI UROPATOGENI

Botta F., Arighi E., Casartelli R., Moretti G., Pieretti B., Tettamanti B., Terramocci R.

Laboratorio Analisi Ospedale "Valduce", via Dante 11, 22100 Como (CO)

Introduzione. Scopo di questo studio è stato quello di valutare "in vitro" l'efficacia dell'Ulifloxacin (ULI), un chinolonico di nuova generazione, su batteri Gram negativi causa di infezioni delle vie urinarie, comparandolo con i chinolonici già in uso. Studi clinici hanno dimostrato che tale farmaco risulta essere molto efficace nel trattamento delle infezioni uroginologiche, in quanto raggiunge un'elevata concentrazione nei tessuti del tratto urogenitale femminile, oltre che nelle urine, mantenendo a differenza degli altri chinolonici di uso comune inalterata la fisiologica flora lattobacillare.

Materiali e Metodi. Sono stati testati 184 campioni di urine positivi per batteri Gram negativi con metodica Kirby-Bauer (inoculo 0.5 McFarland su terreno Mueller Hinton incubato a 37° C per 24 h) con i seguenti antibiotici: Ciprofloxacina (5µg, CIP), Gatifloxacina (5µg, GTX), Levofloxacina (5µg, LEV), Lomefloxacina (10µg, LOM), Moxifloxacina (5µg, MXF), Norfloxacina (10µg, NOR), Ofloxacina (5µg, OFX), Ulifloxacina (5µg, ULI). Gli isolati batterici indagati sono rappresentati da: *Escherichia coli* (47,8%), *Enterobacter aerogenes* (3,3%), *Enterobacter cloacae* (3,8%), *Klebsiella oxytoca* (3,8%), *Klebsiella pneumoniae* (13,6%), *Proteus mirabilis* (15,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,7%), altri germi Gram negativi (3,8%).

Risultati e Discussione. Dall'analisi dei dati sono risultati: resistenti a tutti i chinolonici testati il 20.5 % di *E. coli*, 50% di *E. aerogenes* e *P. aeruginosa*, 71.4% di *E. cloacae*, 8% di *K. pneumoniae* e 37% di *P. mirabilis*; sensibili a tutti i chinolonici testati tranne alla MXF il 68.2% di *E. coli*, 33.3% di *E. aerogenes*, 28.6% di *E. cloacae*, 85.7% di *K. oxytoca*, 84% di *K. pneumoniae* e 44.4% di *P. mirabilis*; casi discordanti (ULI intermedia o sensibile rispetto agli altri chinolonici) per *E. coli* (2.3%), *E. aerogenes* (16.7%), *K. pneumoniae* (4%), *P. mirabilis* (7.4%) e *P. aeruginosa* (6.3%).

Per quanto riguarda quest'ultimo punto l'ULI si è dimostrata l'unica a sensibilità intermedia contro la resistenza registrata per gli altri chinolonici nel 2.3% dei casi di *E. coli* e nel 16.7% di *E. aerogenes*, mentre è risultata l'unica sensibile a fronte di resistenza più o meno accentuata degli altri antibiotici nel 4% dei casi di *K. pneumoniae*, nel 7.4% di *P. mirabilis* e nel 6.3% di *P. aeruginosa*.

Conclusioni. In aggiunta ai casi discussi l'ULI si è rivelata efficace "in vitro" tanto quanto gli altri chinolonici, in accordo con i dati riportati in letteratura, ed inoltre è possibile suggerirne il suo utilizzo a livello clinico in sostituzione agli altri antibiotici della stessa classe per la maggior tolleranza da parte dell'organismo umano.

051

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLE INFEZIONI GENITALI DA *C. TRACHOMATIS* A BOLOGNA

Pignanelli S.¹, Donati M.¹, D'Antuono A.², Shurdhia A.¹, Di Francesco A.³, Baldelli R.³, Burtica E. C.², Della Bella E.¹, Cevenini R.¹

¹DMCSS - Sezione di Microbiologia

- Università degli Studi di Bologna, via Massarenti 9, 40138 Bologna

²DMCSS - Sezione di Dermatologia

- Università degli Studi di Bologna, via Massarenti 9, 40138 Bologna

³Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale

- Università degli Studi di Bologna - via Tolara di Sopra 50,

40064 Ozzano Emilia (BO)

Introduzione. *Chlamydia trachomatis* rappresenta, nei Paesi industrializzati, una delle più frequenti cause di infezioni batteriche sessualmente trasmesse e costituisce un grave problema per la salute pubblica, per il rischio di complicanze cliniche (infertilità). Scopo del presente lavoro è stato quello di identificare, mediante sequenziamento genico, i sierotipi di *C. trachomatis* più frequentemente responsabili di infezioni genitali.

Metodi. Nel periodo compreso tra settembre 2005-maggio 2007 sono stati studiati 1.599 pazienti afferenti all'ambulatorio MTS del Policlinico S. Orsola-Malpighi di Bologna, per sospetta infezione genitale da *C. trachomatis*. La diagnosi di infezione è stata effettuata mediante isolamento di *C. trachomatis* in colture cellulari. I ceppi isolati sono stati successivamente tipizzati attraverso sequenziamento genico.

Risultati. La prevalenza dell'infezione genitale da *C. trachomatis* è risultata del 9.5%, con una distribuzione maggiore nei pazienti di sesso maschile stranieri (22.2%), rispetto a quelli italiani (14.3%), e simile nelle pazienti di sesso femminile straniere (4.9%) ed italiane (4.4%). Il range di età maggiormente interessato dall'infezione è risultato compreso tra 15-24 anni nel sesso femminile e 25-34 anni in quello maschile. Clinicamente sono risultati sintomatici il 25% delle donne e l'83.7% degli uomini. I sierotipi G, E ed F sono risultati i più diffusi nella nostra popolazione.

Conclusioni. I dati ottenuti concordano con quelli della letteratura riguardo a frequenza e distribuzione dell'infezione da *C. trachomatis*. La tipizzazione dei sierotipi isolati ha evidenziato differenze, in termini di prevalenza, rispetto ai sierotipi isolati nella stessa area geografica negli anni '90. Mentre in quel periodo E (36%) e D (26%) risultavano i sierotipi più diffusi, rispetto a G (10.5%), K (10.5%), F (5.6%), J (5.6%), H (5.6%) ed I (1%), oggi G (23%), E (20%) ed F (20%) si sono dimostrati più frequenti di D (13%), J (10%), K (6%), H (3%) ed I (3%). Tali modificazioni sono presumibilmente correlabili al notevole aumento dei flussi migratori.

052

CORYNEBACTERIUM STRIATUM: EPIDEMIOLOGIA E SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI UN PATOGENO EMERGENTE

Pini B., Brigante G., Sokeng G., Gualandris S., Luzzaro F., Toniolo A.

Laboratorio di Microbiologia Medica,
Ospedale di Circolo e Università dell'Insubria, Varese

Introduzione. *Corynebacterium striatum* è un membro della flora cutanea normale che talvolta può causare, anche nei pazienti immunocompetenti, infezioni di ferita e del tratto respiratorio, endocardite e sepsi. Poiché negli ultimi due anni è aumentata la rilevazione di isolati clinici di questa specie, ne abbiamo studiato l'epidemiologia e la sensibilità ai farmaci.

Metodi. Sono stati studiati i ceppi consecutivi e non duplicati di *C. striatum* isolati da gennaio 2006 a maggio 2007 presso il nostro Laboratorio. Per l'identificazione si è utilizzato il sistema BBL Crystal Gram-Positive ID (Becton Dickinson). La sensibilità ai farmaci è stata valutata mediante il metodo Etest (AB Biodisk) includendo le molecole di più recente introduzione (linezolid, daptomicina e chinopristina-dalfopristina). I risultati sono stati interpretati sulla base del documento M45-A (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006).

Risultati. Sono stati valutati 72 isolati di *C. striatum*. La maggior parte dei ceppi (n=61, 84.7%) era stata ottenuta da infezioni della cute e dei tessuti molli. Gli isolati provenivano da reparti diversi, con frequenza maggiore da pazienti di Chirurgia Generale (n=16, 22.2%) e Medicina Interna (n=12, 16.6%). Molti isolati presentavano una resistenza multipla agli antibiotici (inclusi penicillina G, cefalosporine a spettro esteso, tetraciclina, gentamicina, eritromicina, ciprofloxacina). Su questi isolati MDR, oltre a teicoplanina e vancomicina, sono risultati costantemente attivi linezolid, daptomicina e chinopristina-dalfopristina.

Conclusioni. Le infezioni causate da *C. striatum* rappresentano oggi una patologia emergente in ambito ospedaliero. Gli antibiotici recentemente introdotti per il trattamento delle infezioni della cute e dei tessuti molli possono rappresentare una valida alternativa ai glicopeptidi.

053

VALUTAZIONE DELLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE PER *M. tuberculosis* SU CAMPIONI DI BAL IN RELAZIONE AL QUANTIFERON TB-GOLD.

Prignano G.¹, Bordinon V.¹, Gallo M.T.¹, Belardi M.¹, Vento A.¹, Cilli L.¹, De Santis A.¹, Stivali F.¹, Ranazzi A.¹, Filippetti M.², De Mori P.³, Cordiali Fei P.¹, Ensoli F.¹.

¹SC Patologia Clinica e Microbiologia, Polo Dermatologico e

²SC Chirurgia Toracica, Polo Oncologico - Istituti Fisioterapici Ospitalieri - Roma.

³Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche - INMI - Roma.

Introduzione. L'introduzione di nuovi test *in vitro* per la diagnosi di infezione tubercolare latente (ITBL), basati sulla produzione di IFN- γ da parte di linfociti T indotta da antigeni specifici di *M. tuberculosis*, comporta la necessità di rivalutare le casistiche cliniche analizzate con il tradizionale test cutaneo. Abbiamo valutato i risultati del test QuantiFERON TB-gold in relazione all'analisi microbiologica per *M. tuberculosis*.

Materiali e Metodi. Sono stati inclusi nello studio 100 campioni di BAL di altrettanti pazienti sottoposti ad esame broncoscopico per sospetto di patologia neoplastica o infiammatoria. I campioni di lavaggio bronchiale sono stati trattati per fluidificazione e decontaminazione con SNAP N' DIGEST (SDL, USA) prima della semina in terreno solido Lowenstein-Jensen (BBL) e in terreno liquido MGIT (BBL): l'incubazione a 37°C veniva protratta per 8 settimane. La tipizzazione dei ceppi dei micobatteri è stata eseguita mediante il metodo ACCUPROBE (BioMérieux) nel laboratorio di Microbiologia dell'INMI di Roma. A tutti i pazienti è stato prelevato contestualmente all'esame broncoscopico un campione di sangue per la valutazione della produzione di IFN- γ indotta dagli antigeni Esat-6, CFP-10 e TB 7.7 di *M. tuberculosis* (QuantiFERON-TB Gold, Cellestis, Australia).

Risultati. La prevalenza di ITBL nella popolazione studiata era del 32%; nel 5% dei pazienti il risultato del test era indeterminato per anergia dei linfociti.

L'esame colturale ha rivelato una infezione da *M. gordonae* in un soggetto QuantiFERON negativo, mentre in 4/32 pazienti QuantiFERON positivi l'esame colturale è risultato positivo per *M. tuberculosis*.

Conclusioni. I risultati confermano la specificità del test immunologico e confermano il dato riportato dalla letteratura relativo al rischio di sviluppare la malattia nel 10-20% dei casi di ITBL.

054

SCREENING PER *S. AGALACTIAE*: SEMINA DIRETTA VS SEMINA DOPO ARRICCHIMENTO SU TERRENI CROMOGENI

Grigis A., Arosio M., Facheris M.A., Moioli F., Goglio A.

Microbiologia e Virologia, Ospedali Riuniti, Bergamo

Premesse. I CDC di Atlanta consigliano lo screening delle gravide alla 35^a-37^a settimana per la ricerca della colonizzazione vaginale e rettale da *Streptococcus agalactiae* (Schrage S e al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. *MMWR* 2002; 51:2-18). Nella nostra realtà due terzi delle gravide effettuano la ricerca alla 35^a-37^a settimana. Se non effettuato durante la gravidanza, lo screening viene richiesto al momento del ricovero per il parto, con richiesta di risposta in tempi necessariamente brevi. In caso di positività è, infatti, prevista la somministrazione di profilassi antibiotica al parto per la protezione del neonato nei confronti dell'infezione.

Obiettivo. Valutare i risultati, in termine di tempi di risposta, di sensibilità e di specificità, delle indagini colturali su terreno cromogeno, eseguite con semina diretta e dopo arricchimento in brodo selettivo.

Metodi. I campioni sono stati raccolti con tampone a livello del terzo inferiore della vagina e in sede anorettale al momento dell'ingresso in ospedale per parto ed immessi in un terreno di trasporto (terreno di Amies). All'arrivo in microbiologia i tamponi sono strisciati su una piastra di terreno cromogeno (Agar chromID StreptoB, STRB, bioMérieux), direttamente e dopo incubazione overnight in terreno di Todd Hewitt con Acido nalidixico e Colistina (Todd Hewitt Brodo + Antibiotici, TODD H-T, bioMérieux). Tutte le colonie da rosa pallido a rosso, rotonde e perlaccee, sono state sottoposte a test biochimici ed immunologici per la conferma di specie.

Risultati. La positività dei nostri campioni è risultata del 23% (25% per i tamponi rettali, del 21% per i prelievi vaginali). La positività dalla semina diretta è del 14% (che sale al 15% dopo reincubazione delle piastre). Dalla semina dopo arricchimento si è osservata la positività in un ulteriore 7% dei campioni. Considerando i soli campioni positivi (da semina diretta e/o dopo arricchimento) la sensibilità della semina diretta a 24 ore è risultata del 62%.

Conclusioni. L'identificazione delle colonie di *S. agalactiae* sul terreno cromogeno si è rilevata semplice, senza necessità di ulteriori isolamenti, e meno soggettiva delle ricerche della beta-emolisi su agar sangue. I terreni cromogeni, inoltre, rilevano anche i rari ceppi di non emolitici. I nostri risultati confermano però la necessità di procedere sempre all'arricchimento in brodo, pena il mancato riconoscimento di positività di quasi la metà dei casi.

055

VALUTAZIONE DI UN TERRENO CROMOGENO PER LO SCREENING DI *S. AGALACTIAE* IN GRAVIDANZA

Restelli A., Ranzi M.L., Fiore A.V., Bozzola M., Torresani E.

Laboratorio di Microbiologia,, Fondazione IRCCS Policlinico, Ospedale Maggiore, Mangiagalli e Regina Elena,, Milano

Introduzione. Le infezioni neonatali da *Streptococcus agalactiae*, trasmesso dalla madre al neonato durante il parto, sono associate ad elevata morbilità e mortalità.

Lo screening per la ricerca di *S. agalactiae* e l'adozione di una opportuna profilassi antibiotica intraparto rappresentano una strategia efficace per la prevenzione.

Nel nostro studio abbiamo valutato un terreno solido selettivo cromogeno per la ricerca di *S. agalactiae* (Strepto B ID - BioMérieux) in confronto con agar Columbia CNA con 5% sangue di montone.

Metodi. Da Gennaio a Maggio 2007 sono stati esaminati 320 tamponi vaginali o vagino-rettali di donne in gravidanza (alla 35^a alla 37^a settimana di gestazione) provenienti dall'ambulatorio Ostetrico-Ginecologico della Fondazione.

La lettura è stata effettuata a 18-24 h e 48 h per entrambi i terreni dopo incubazione a 37° in aerobiosi per Strepto B ID e in CO₂ per CNA: le colonie sospette, rosa-rosse su Strepto B ID e beta emolitiche su CNA, sono state confermate mediante test di agglutinazione al lattice.

Risultati. Dei 320 campioni esaminati, 60 sono risultati positivi per *S. agalactiae*, con un percentuale di colonizzazione del 18,75%. La sensibilità è risultata del 100% per Strepto B ID contro il 96% per CNA. La specificità è risultata del 97% per Strepto B ID e del 94% per CNA.

Degli 8 falsi positivi su Strepto B ID, 7 sono stati osservati prolungando l'incubazione a 48h.

Conclusioni. La caratteristica colorazione delle colonie di *S. agalactiae* su Strepto B ID è di facile lettura anche in caso di basse cariche e di colture miste mentre in tali casi l'utilizzo di CNA richiede l'isolamento delle colonie per la loro identificazione: inoltre la presenza di ceppi non emolitici su CNA può non essere rilevata fornendo risultati falsamente negativi.

La nostra esperienza ha dimostrato che l'utilizzo del terreno cromogeno Strepto B ID garantisce una elevata sensibilità e specificità e fornisce risultati in tempi rapidi rendendolo idoneo per lo screening prenatale di *S. agalactiae* allo scopo di prevenire le gravi infezioni nel neonato.

056

IL NUOVO SAGGIO ELISA PER LA RILEVAZIONE RAPIDA DI INFEZIONE TUBERCOLARE PUÒ ESSERE UTILIZZATO NEI BAMBINI ?

Russo C.¹, Coltella L.¹, Tozzi A.E.², Menichella D.¹

¹U.O. di Microbiologia,

²U.O. di Epidemiologia Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù" - Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

Introduzione. L'incidenza della Tubercolosi è stimata dall'OMS in circa nove milioni di casi/anno di cui 1 milione nei bambini. La diagnosi di Tubercolosi nel paziente pediatrico risulta difficile per la mancata evidenza di segni e sintomi tipici. Negli ultimi anni è stato messo a punto un saggio rapido in grado di valutare la quantità di Interferon- γ rilasciato dai linfociti stimolati con antigeni specifici del *M. tuberculosis complex* direttamente da prelievo ematico QuantiFERON-TB Gold (QFT-G). Il QFT-G è stato inserito nelle linee guida statunitensi e inglesi per lo screening tubercolare. A tutt'oggi mancano dati riferibili ai pazienti pediatrici.

Metodi. Dal Maggio 2004 a Maggio 2006 abbiamo consecutivamente arruolato allo studio 263 pazienti valutati presso l'Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù" per sospetta infezione o malattia tubercolare (storia di recente contatto TB, tosse persistente da più di 2 settimane, febbre non rispondente alla terapia, immagini radiologiche compatibili con lesioni polmonari o interessamento linfonodale mediastinico). I pazienti hanno ricevuto le procedure diagnostiche (microbiologiche e radiologiche) in uso presso il nostro Ospedale e, in aggiunta, è stato prelevato una aliquota di sangue eparinizzato per eseguire il test di linfostimolazione QFT-G. Lo studio è stato eseguito in cieco.

Risultati. 263 bambini suddivisi in: 107 pazienti ricoverati (57,9% sotto i 5 anni e 42,1%) e 156 bambini seguiti in day Hospital (39,1% sotto 5 anni e 60,9% sopra) . I risultati QFT-G sono stato Positivo in 49 casi, Negativo in 189 e Indeterminato i 25 bambini. La sensibilità del test nei bambini al di sotto dei 5 anni di età è stata tra l'88,5% e il 95,6% e la Specificità e il Valore predittivo Positivo è stato del 100%.

Conclusioni. I risultati ottenuti mostrano che la popolazione pediatrica può essere candidata allo screening per la valutazione di infezione tubercolare con Test ELISA QFT-G.

057

DECONTAMINAZIONE BATTERICA DEI SITI ALVEOLARI MEDIANTE L'UTILIZZO DEL LASER AD ERBIO

Sacchi M.C.¹, Meloni M.², Bellanda M.³, Rocchetti A.⁴, Canepari M.⁴, Caraccio V.⁴, Debbia E.⁵

¹Ematologia, Azienda Ospedaliera, Alessandria.

²Libero Professionista, Roma

³Libero Professionista, Alessandria

⁴Soc Microbiologia, Azienda Ospedaliera, Alessandria

⁵Sez. Microbiologia, DISCAT, Università degli Studi, Genova

Introduzione. In odontoiatria dati di letteratura riportano l'eccellente capacità della luce laser di decontaminare i siti post-

estrattivi, a prescindere dallo stato di sepsi riscontrato. Diverse tecniche possono essere applicate nel sito implantare per ottenere una decontaminazione:

- a) tecnica meccanica, ottenuta con curettage dell'alveolo in abbinamento a lavaggi ed impiego di soluzione antibiotica;
- b) applicazione della luce laser.

Gli autori hanno deciso di utilizzare la luce laser per contribuire a rafforzare la convinzione che il laser è supporto fondamentale sia per la decontaminazione del sito estrattivo che per l'ottimizzazione dell'area ad uso implantare permettendo, pertanto, di inserire l'impianto nella stessa seduta. In questo lavoro è stata valutata la capacità decontaminante batterica del Laser Er:YAG nel sito alveolare post-estrattivo, in presenza di flogosi cronica, per un utilizzo dell'alveolo stesso ai fini implantari immediati.

Metodi. Sono stati presi in esame pazienti con situazioni di sepsi alveolare (parodontopatie o processi apicali). Dopo l'avulsione del dente sono stati eseguiti, mediante tamponi sulla ferita, prelievi di materiale alveolare sia prima che immediatamente dopo il passaggio del Laser Er:YAG nell'alveolo secondo un protocollo stabilito.

Risultati. Le analisi microbiologiche hanno dimostrato che prima dell'intervento del Laser Er:YAG nel sito operatorio erano presenti differenti specie di batteri tipiche della flogosi parodontale. Dopo il trattamento con il Laser Er:YAG si è potuto constatare una significativa riduzione della carica batterica nelle aree in esame.

Conclusioni. Lo studio dei casi clinici analizzati in questo lavoro ha dimostrato come l'utilizzo del Laser Er:YAG nel trattamento dei siti alveolare post-estrattivi con documentata flogosi batterica rappresenti una valida ed efficace metodologia per la decontaminazione del sito operatorio. Secondo gli autori l'impiego della luce laser permetterebbe di ottenere la garanzia biologica che il sito è efficacemente decontaminato.

058

METODI RAPIDI ED ISOLAMENTO CULTURALE NELLO SCREENING PER STREPTOCOCCO DI GRUPPO B.

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

¹Dip. Di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Divisione di Microbiologia, Università di Bologna

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

Introduzione. In era pre-profilassi antibiotica intrapartum (IAP) lo streptococco di gruppo B (GBS) era considerato responsabile di infezioni neonatali precoci (early onset disease EOD) nel 2-3/1000 dei nati, con 5-20% di mortalità ed importanti esiti a distanza. Le linee-guida dei CDC del 2002 hanno ribadito l'efficacia dello screening culturale con tampone vagino-rettale a 35-37 settimane di EG per identificare le gravide colonizzate da sottoporre a IAP e ridurre il rischio di EOD (MMWR 2002). Una recente review (Honest H. *Pediatrics* 2006) ha valutato l'affidabilità di metodiche rapide intrapartum per l'identificazione di GBS che possano risolvere criticità metodologiche e organizzative connesse alle linee-guida dei CDC. Scopo dello studio è stato confrontare la colonizzazione da GBS mediante isolamento culturale (gold standard), con metodiche laboratoristiche differenti.

Metodi. 230 tamponi vaginali intrapartum sono stati valutati

mediante isolamento colturale, real-time PCR, TEST ULTIMED STREP B (metodo immunocromatografico) e STREP B OIA (saggio immunoenzimatico). Per ciascuna metodica è stata calcolata la concordanza con i risultati della coltura e con la PCR.

Risultati. GBS è stato identificato mediante coltura nel 11% di campioni, mediante RT-PCR nel 25%. Tra i test rapidi STREP B OIA ha dimostrato discreta concordanza con la coltura e tempi di esecuzione più rapidi della RT-PCR. I valori percentuali di concordanza positiva fra RT-PCR e coltura, e fra coltura e OIA sono stati rispettivamente del 96% e del 54%. I valori di concordanza negativa sono stati del 84% fra coltura e RT-PCR e del 78% fra coltura ed OIA. Decisamente inferiori i dati di concordanza fra metodo immunocromatografico e coltura (15% per la positività e 99% per la negatività). Fra RT-PCR ed OIA i valori di concordanza sono stati del 32% (positiva) e del 80% (negativa). **Conclusioni.** dati preliminari confermano la maggior sensibilità di RT-PCR rispetto a coltura; STREP B OIA ha discreta concordanza con coltura e rapidità d' esecuzione. Riteniamo dunque che STREP B OIA possa rappresentare metodica di screening da utilizzare intrapartum per individuare le gravide a cui somministrare la IAP, mentre la RT-PCR si propone come metodo rapido per lo screening intrapartum dotato di elevata sensibilità e specificità.

059

EFFETTO IN VITRO ED EX VIVO DEI FARMACI ANTITUBERCOLARI SUL RILASCIO DI IFN- γ

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

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

Introduzione. La tubercolosi si pone tuttora come una delle patologie infettive di maggiore impatto clinico ed epidemiologico per la sanità pubblica. L'obiettivo di questo lavoro è di valutare l'utilizzo del QuantiFERON-TB Gold (QFT-RD1) come parametro per il monitoraggio della terapia antitubercolare e studiare l'eventuale interferenza in vitro di tali farmaci nel rilascio di IFN- γ .

Metodo. 34 soggetti con conferma clinico-microbiologica di infezione tubercolare, sono stati valutati con il test QFT-RD1, eseguendo prelievi ematici prima dell'inizio della terapia (T0), durante e a fine trattamento (T1-T2-T3). Per l'interferenza con i farmaci antitubercolari: aliquote di 500ml di sangue eparinato sono state stimolate con PHA (10 μ g/ml) e incubate per 18h a 37°C con Streptomycina, Isoniazide, Rifampicina ed Etambutolo a 4 concentrazioni seriali a raddoppio: INH 5 μ g/ml, RIF 7 μ g/ml, ETB 5 μ g/ml, STR 40 μ g/ml. Il rilascio di IFN- γ è stato quantificato mediante saggio ELISA.

Risultati. Tutti i pazienti avevano un risultato positivo al test al tempo T0. Le determinazioni eseguite durante la terapia specifica (T1-T2-T3) mostrano che in 16 pazienti (47%) il test risulta negativo a fine trattamento terapeutico (Media IFN- γ : 4,26UI/ml al T0; 3,68UI/ml al T1; 1,23UI/ml al T2; 0,07UI/ml al T3).

In 18 pazienti (52%), il test risulta ancora positivo durante il trattamento; in particolare in 10 soggetti si è evidenziato un decre-

mento di IFN- γ prodotto (7.41 UI/ml al T0; 4,37UI/ml al T1; 2,23UI/ml al T2) mentre in 8 si è evidenziato un incremento di IFN- γ prodotto (2.96 UI/ml al T0; 5.60UI/ml al T1).

Gli esperimenti in vitro con i farmaci antitubercolari hanno evidenziato inoltre una downregolazione dose-dipendente sul rilascio di IFN- γ .

Conclusioni. La negativizzazione del test a fine trattamento terapeutico nei 16 pazienti, unito ad un outcome clinico favorevole, evidenzia un possibile utilizzo del test ai fini del monitoraggio. Gli esperimenti in vitro pongono l'attenzione sull'eventuale interferenza dei farmaci sul rilascio di IFN- γ .

060

SIEROIMMUNOLOGIA DI *TREPONEMA PALLIDUM*: VALUTAZIONE DI UN NUOVO SISTEMA QUALI/QUANTITATIVO IN CHEMILUMINESCENZA AUTOMATIZZATO

Savino O., Greco F., Tenuta R., Orrico F., Senatore C., Gallo M., Palermo M., Giandomenico A.M., Noto A., Giraldi C.

Microbiologia e Virologia, Ospedale Annunziata, AO Cosenza

Introduzione. Il *Treponema pallidum* è un batterio elicoidale, mobile appartenente alla famiglia delle Treponemataceae. E' l'agente eziologico della Sifilide, una malattia a trasmissione venerea la cui diagnosi è prevalentemente sierologica. La diagnosi si basa sulla ricerca di anticorpi specifici (treponemici) e di anticorpi aspecifici antilipoidei (non treponemici). I primi sono il TPHA (Treponema Pallidum Haemoagglutination Assay) e l'FTA ABS (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test). Il TPHA saggia gli anticorpi totali specifici diretti contro il *Treponema Pallidum*, mentre l'FTA-ABS permette di differenziare la presenza delle IgG e delle IgM. La VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory) è un test non treponemico che utilizza come antigene la cardiolipina, estratto lipidico del cuore di bue. È un test altamente sensibile, poco specifico, ed è utilizzato nel monitoraggio terapeutico.

Metodi. Sono stati sottoposti ad indagine n. 100 pazienti provenienti dalla routine del nostro laboratorio.

Su tutti i campioni sono stati eseguiti i seguenti test: VDRL (LTA), TPHA (Biosystems), FTA-ABS IgG e IgM (Alphadia).

Gli stessi campioni sono stati processati con il test qualitativo Liaison Treponema Screen (Dia Sorin). Il test si basa sul principio del dosaggio a uno step ed impiega la tecnologia di rilevazione in chemiluminescenza con valutazione dei risultati quali/quantitativi espressi in index.

Risultati. I 100 pazienti esaminati comparativamente con test convenzionali (TPHA, VDRL, FTA-ABS) e Liaison Treponema Screen hanno dato i seguenti risultati: n. 64 negativi concordemente con tutte le metodiche utilizzate, n. 33 positivi sia ai test convenzionali che al Liaison Treponema Screen e n. 3 discordanti, con concordanza di positività in FTA-ABS e Liaison Treponema Screen e sieronegatività a TPHA.

Conclusioni. Il test Trep-DiaSorin ha dimostrato una buona concordanza con i metodi convenzionali soprattutto nei riguardi di FTA-ABS, inoltre, nelle nostre mani ha mostrato ottime performance quali facilità e rapidità d'esecuzione, superando i tempi di refertazione dei test tradizionali spesso legati all'interpretazione soggettiva dei risultati.

061

L'UTILITÀ DEL SOFTWARE VIGI@ct® PER DESCRIVERE E COMUNICARE ALLE U.O. LA DISTRIBUZIONE E LE CARATTERISTICHE DI RESISTENZA DEGLI ISOLATI (ANNO 2006)

Secondini S.¹, Martini C.¹, Bevilacqua A.¹, Brecciaroli F.¹, Ciavarella L.¹, Paccagnani B.¹, Sardellini C.², Sirocchi S.¹, Pauri P.¹

¹Unità Operativa Patologia Clinica, Ospedale di Jesi (AN), Zona territoriale 5, ASUR Marche, viale della Vittoria 76, 60035 Jesi (AN)

²Unità Operativa Anestesia e Rianimazione, Ospedale di Jesi (AN), Zona territoriale 5, ASUR Marche, viale della Vittoria 76, 60035 Jesi (AN)

Introduzione. L'obiettivo dell'indagine è stato quello di valutare l'utilità e le performance del software VIGI@ct® bioMérieux® SA, nello studio delle infezioni ospedaliere del nostro Presidio, con particolare riguardo alla sorveglianza dei batteri multiresistenti (BMR), nel corso dell'anno 2006.

Metodi. Il laboratorio di Microbiologia della U.O. utilizza VIGI@ct® come software di monitoraggio delle infezioni ospedaliere, mediante l'impostazione di alcune regole software. Il sistema, interfacciato con Vitek2®, acquisisce i risultati relativi ad identificazione e antibiogrammi degli isolati, li confronta con la banca dati residente e li interpreta mediante un algoritmo.

Risultati. Sono stati esaminati 24.251 campioni di cui il 28,5% di provenienza nosocomiale e il 71,5% ambulatoriale. 7.253 campioni sono risultati positivi (29,9%): 41,2% gram positivi, 41,6% gram negativi, 10% miceti e lieviti, 7,2% altri batteri. I gram positivi più frequenti sono stati Streptococchi (27,1%) e Stafilococchi (13,4%), con *E. faecalis* che rappresenta il germe più isolato (16,7%). La maggior parte dei gram negativi sono *E. coli* (21,0%) e *P. aeruginosa* (6,2%). Tra lieviti e miceti la più frequente è *C. albicans* (6,8%).

Le U.O. ospedaliere con incidenza di infezione maggiore sono la Rianimazione (20,0%) e la Pediatria (10,0%).

I microrganismi sospetti responsabili di infezione nosocomiale secondo i criteri impostati dal software, sono stati in totale 215 germi, la maggior parte Candida (33,0%), delle quali *C. albicans* rappresenta il 69%. VIGI@ct® ha rilevato inoltre 65 *K. pneumoniae* multiresistenti (sensibili solo a meropenem e imipenem), 263 ESBL, 103 MRSA e 14 Enterococchi VAN A.

Conclusioni. L'utilizzo di VIGI@ct® permette di conoscere e descrivere l'epidemiologia locale, di fornire ai reparti report riepilogativi periodici che permettono di costruire in modo ottimale la terapia empirica e quindi di creare una migliore integrazione tra i microbiologi e i medici delle U.O. richiedenti.

062

IN MICROBIOLOGIA CONTINUIAMO A PREFERIRE PRATICHE INUTILI E COSTOSE RISPETTO A QUANTO POTREBBE MIGLIORARE CON MINOR SPESA DIAGNOSI E PREVENZIONE: ALCUNI ESEMPI DI APPLICAZIONE DELL'EBM

Secondini S.¹, Brecciaroli F.¹, Brunella B.¹, Forconi G.¹, Martini C.¹, Martini S.¹, Pauri P.^{1,2}, Giocoli G.²

¹Unità Operativa Patologia Clinica, Ospedale di Jesi (AN), Zona territoriale 5, ASUR Marche, viale della Vittoria 76, 60035 Jesi (AN)

²Gruppo di Lavoro EBM AMCLI, Via C. Farini 81 - 20159 Milano

Introduzione. Il moderno microbiologo clinico collabora alla diagnosi delle infezioni applicando le migliori evidenze scientifiche disponibili in stretta cooperazione con i clinici. Presentiamo alcuni esempi della nostra attività nel corso del 2006-2007.

Metodi e risultati. Per la coprocultura di routine, abbiamo proposto la "regola dei 3 giorni", con l'eliminazione di questa richiesta per pazienti ospedalizzati da più di 3 giorni. La diagnostica può invece essere potenziata mediante studi selettivi, con l'aggiunta alla ricerca standard di Salmonella e Shigella quella di Campylobacter, *E. coli* *OK157:H7*, *C. difficile*, parassiti, in funzione delle condizioni cliniche ed epidemiologiche. Abbiamo perciò concordato con i clinici nuove modalità di richiesta.

Per la diagnostica delle polmoniti comunitarie (CAP), recenti linee guida di Società Scientifiche indicano che uno spettro completo di accertamenti microbiologici non è appropriato per ogni paziente con sospetta CAP. Il ricorso a test specifici dovrebbe essere guidato dalla gravità della malattia, dai fattori di rischio e dalla risposta al trattamento, secondo accordi localmente condivisi con i clinici. Abbiamo dunque proposto agli specialisti del nostro Ospedale raccomandazioni con diverso grado di evidenza e ne è seguita una drastica riduzione delle richieste di accertamenti per CAP.

Per quanto riguarda la Chlamydia trachomatis, le linee guida NICE 2000, CDC 2002 e 2006 indicano i casi in cui è proponibile la sua ricerca mediante test molecolari. Costituiscono fattori di rischio: età <25 anni delle donne, mancato utilizzo di profilattico, anamnesi positiva per MTS, ecc. Le tecniche NAAT mostrano elevata sensibilità, ma frequenti falsi positivi in situazioni di bassa prevalenza. È fondamentale quindi che i richiedenti siano informati delle prestazioni dei test e delle corrette indicazioni alla richiesta. La nostra esperienza nell'uso di un test NAAT automatizzato (Probetec, Becton Dickinson), l'elevato numero di test effettuati (2.446 nel 2006) ed infine la partecipazione alla policentrica GLIST da gennaio 2007, ci hanno permesso di constatare la frequente inappropriatezza della richiesta che, in collaborazione con i clinici, stiamo cercando di migliorare.

063

DATI EPIDEMIOLOGICI SULLE INFEZIONI SESSUALMENTE TRASMISSIBILI (IST) A BOLOGNA

Shurddhi A.¹, Pignanelli S.¹, Negosanti F.², Andreyeva S.², Burtica E. C.², D'Antuono A.²

¹DMCSS - Sez. di Microbiologia - Università degli Studi di Bologna - Via Massarenti 9, 40138 Bologna

²DMCSS - Sez. di Dermatologia - Università degli Studi di Bologna - Via Massarenti 9, 40138 Bologna

Introduzione. Le IST rappresentano un problema sanitario e sociale di primaria importanza a livello mondiale per l'elevata diffusione, per le sequele cliniche e per le risorse economiche richieste per la cura. In questo studio è stata indagata l'incidenza delle IST ed i fattori di rischio ad esse correlabili.

METODI: Da gennaio a dicembre 2006 sono stati studiati pazienti a rischio per infezioni veneree presso l'ambulatorio MTS del Policlinico S. Orsola-Malpighi di Bologna. La diagnosi di infezione è stata posta attraverso evidenze cliniche (anamnesi ed esame obiettivo) e laboratoristiche (indagini culturali, microscopiche e sierologiche). Sono state studiate infezioni veneree "classiche" sorrette da *T. pallidum*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* ed *H. Ducreyi* ed alcune delle infezioni veneree "di seconda generazione" sorrette da HPV, HSV-2, HIV e dal genere *Molluscipoxvirus*.

Risultati. Attraverso un'analisi clinico-laboratoristica sinergica sono stati diagnosticati 773 nuovi casi di infezione veneree. Tra i nuovi casi di IST diagnosticati, quelli che hanno dimostrato, una maggiore incidenza in assoluto sono stati da HPV (38.3%) e da *T. pallidum* (23%), seguiti da HSV-2 (14.9%), *N. gonorrhoeae* (11.5%), *C. trachomatis* (9%), *Virus del Mollusco contagioso* (8%) ed *H. ducreyi* (0.1%). E' stata valutata inoltre una concomitante infezione da HIV nell'1.7% dei nuovi casi di infezione diagnosticati. Tra i fattori di rischio valutati (età, etnia, uso di droghe, contracccezione, n° di partner, ecc.), quelli risultati maggiormente implicati nella diffusione delle infezioni indagate, sono rappresentati dal mancato utilizzo (83%) di contraccettivi di barriera (condom) e dall'elevata promiscuità sessuale (≥3 partner, nei sei mesi precedenti l'indagine, nel 59.8% dei casi).

Conclusioni. I dati ottenuti dimostrano, come per altro descritto in letteratura, l'elevata frequenza delle IST, evidenziando, inoltre, i fattori di rischio maggiormente implicati nella diffusione di tali infezioni. Gli studi epidemiologici di queste infezioni, pertanto, rappresentano uno strumento estremamente importante di consultazione per pianificare nuove strategie di intervento e di prevenzione.

064

UTILIZZO DEL TERRENO CROMOGENO MRSA ID NELLA SORVEGLIANZA DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-RESISTENTE IN UN REPARTO A BASSA ENDEMIA PER MRSA.

Paccagnella S.¹, Tessari A.¹, Squarzon L.¹, Scarin M.¹, Munari M.², Cavallaro A.¹

¹UO Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova.

²UO Neurochirurgia TIPO, Azienda Ospedaliera di Padova.

Introduzione. Lo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente è uno dei più comuni patogeni responsabile di infezioni nosocomiali. La maggior parte delle infezioni ospedaliere da *S. aureus* sono causate da ceppi presenti nella cute o nelle mucose prima del ricovero e il principale mezzo di trasmissione tra pazienti è rappresentato dalle mani contaminate degli operatori sanitari. Una rapida diagnosi di infezione da MRSA è di fondamentale importanza per approntare una terapia adeguata e adottare le opportune misure per evitare la trasmissione del microrganismo ad altri pazienti.

Materiali e metodi. Nel periodo aprile-giugno 2007 sono stati analizzati 25 pazienti provenienti dal reparto di Terapia Intensiva Neurochirurgica dall'Azienda Ospedaliera di Padova. Per ciascun paziente sono stati effettuati 3 tamponi faringei (TF) e 3 nasali (TN) (all'ingresso e al secondo e sesto giorno di ricovero), al fine di poter evidenziare i tempi dell'eventuale colonizzazione da MRSA. I campioni sono stati seminati in parallelo su terreno cromogeno MRSA ID (4 mg/L di cefoxitina) e su agar sangue e incubati per 18/24 ore a 37°C. Si è poi proceduto all'identificazione e all'antibiogramma, con metodo Vitek2, delle colonie di stafilococco.

Risultati. L'analisi di 150 campioni ha rivelato un totale di 40 tamponi positivi per *Staphylococcus aureus*, appartenenti ad 8 pazienti. Sei ceppi con fenotipo MRSA sono stati isolati da 2 di questi pazienti. Nel primo caso MRSA è stato isolato da TN fin dal momento del ricovero e da TF al sesto giorno, mentre nel secondo paziente la positività è stata riscontrata al sesto giorno di ricovero sia su TF che TN. L'identificazione di *Staphylococcus aureus* tramite MRSA ID è risultata concorde al 100% con i risultati ottenuti dalla semina in agar sangue e successiva identificazione e antibiogramma con Vitek2, sia per i ceppi meticillina sensibili che per MRSA.

Conclusioni. Lo studio è stato condotto su pazienti provenienti da un reparto a bassa endemia di MRSA (8%) e in cui risultasse di sicura utilità pratica l'individuazione tempestiva di eventuali portatori di MRSA al momento del ricovero. Il terreno MRSA ID, identificando *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti in meno di 24 ore, si rivela un valido ausilio per la tempestiva e accurata diagnosi di questo patogeno.

065

UTILITÀ DI UN TEST RAPIDO PER URINOCOLTURA E ANTIBIOGRAMMA NELLA DIAGNOSI E NEL TRATTAMENTO DELLE INFEZIONI URINARIE NEL PAZIENTE PEDIATRICO

Tessari A.¹, Zambolin M.², Bergo C.¹, Da Dalt L.³, Cavallaro A.¹¹UO Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova.²Dipartimento di Pediatria, Università di Padova.

Introduzione. L'infezione delle vie urinarie rappresenta una patologia di frequente riscontro in età pediatrica anche se l'assenza di sintomi specifici e la difficoltà di comunicazione rendono difficile la diagnosi, soprattutto nei pazienti più piccoli. La disponibilità in tempi rapidi del referto di urocoltura ed antibiogramma permette di approntare una terapia antibiotica corretta e limitata ai casi di effettiva necessità.

Materiali e metodi. Lo studio, condotto su 181 pazienti di età compresa tra 1 mese e 15 anni che presentavano leucocituria, pervenuti al Pronto Soccorso della Clinica Pediatrica di Padova nel periodo gennaio-maggio 2007, prevedeva l'esecuzione di urocoltura tramite screening con il sistema UroQuick (UQ) e successivo processamento dei campioni positivi mediante coltura in piastra.

L'identificazione e l'antibiogramma sono stati eseguiti mediante sistema VITEK2. In parallelo, sui campioni positivi con UQ, utilizzando il medesimo strumento e un'incubazione di 3 ore, è stato allestito un antibiogramma con un pannello di 5 antibiotici (Amoxicillina/Clavulanato-AMC, Gentamicina-GM, Cotrimossazolo-SXT, Ceftriaxone-CRO e Ciprofloxacina-CIP), utilizzando come inoculo un'aliquota del brodo proveniente dallo screening di crescita batterica. Su tutti i campioni positivi a UQ è stato allestito un vetrino colorato al Gram per l'identificazione preliminare dell'agente infettante.

Risultati. L'urocoltura è risultata positiva in 74 dei 181 campioni esaminati, con una prevalenza di enterobatterie dell'82%, di streptococchi ed enterococchi del 5,4%, e di gram-negativi non fermentanti del 2,7%. I rimanenti campioni erano rappresentati da colture miste gram positivi/gram negativi. Per le enterobatterie, la concordanza tra UroQuick e Vitek2 è stata del 94% per AMC, del 100% per GM, CIP e CRO e del 97% per SXT. I non fermentanti hanno rivelato una concordanza del 100% per GM, CIP, SXT, mentre per streptococchi/enterococchi la corrispondenza tra i due metodi è stata del 100% per CIP e AMC.

Conclusioni. L'aumento delle resistenze batteriche rende necessario limitare l'uso improprio degli antibiotici.

Il sistema UroQuick, permettendo la refertazione dell'antibiogramma in 6 ore e con un elevato livello di affidabilità, rappresenta un valido strumento per la diagnosi e il trattamento delle infezioni urinarie nel paziente pediatrico.

066

EPIDEMIOLOGIA DEI BATTERI ENTEROPATOGENI DA INFEZIONE UMANA DEL VENETO NEL 2005-2006 E ANALISI DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA ASSOCIATA A SALMONELLA.

Tessari A.¹, Tommasini T.¹, Guidolin T.¹, De Canale E.¹¹ UO Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova.

Introduzione. Il Servizio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova si occupa dal 2005 nell'ambito del progetto Entenet-Italia della raccolta, tipizzazione e studio dell'antibioticoresistenza dei ceppi di *Salmonella*, oltre che della raccolta e identificazione di altri enterobatteri patogeni isolati da fonte umana nella Regione Veneto.

Metodi. Nel biennio 2005-2006 sono giunti all'attenzione del centro oltre 2000 ceppi di batteri enteropatogeni di cui 1567 appartenenti al genere *Salmonella*. Tutti i ceppi di *Salmonella* sono stati tipizzati mediante agglutinazione rapida su vetrino secondo lo schema di Kauffman-White. Un antibiogramma con metodo Kirby-Bauer con un pannello di 11 antibiotici è stato eseguito su 692 ceppi di *Salmonella* pervenuti nel 2006. I ceppi di *Campylobacter* sono stati identificati con metodo a galleria API Campy mentre per gli altri enterobatteri sono stati utilizzati la card ASTN-020 del sistema VITEK2 e gli antisieri specifici.

Risultati. I sierotipi di *Salmonella* spp. appartenenti ai gruppi B (O:4,5) e D (O:9) sono stati quelli più frequentemente riscontrati sia nel 2005 che nel 2006, contando complessivamente 870 e 380 isolamenti, pari al 80% del totale. Lo studio dell'antibioticoresistenza ha rivelato la presenza di 313 ceppi con resistenza a 4 o più antibiotici, pari al 45% del totale esaminato. *Salmonella typhimurium* con fenotipo di resistenza multipla ad Ampicillina, Streptomina, Tetraciclina e Sulfamidico (ASSuT) e *Salmonella enteritidis* sensibile a tutti gli antibiotici testati, rispettivamente il 20,5% e il 16,3% del totale, si sono rivelati i sierotipi più riscontrati nel 2006, con isolamenti diffusi a tutte le province della regione. Gli isolamenti di *Campylobacter* spp. nel biennio sono stati 586, mentre risultano sporadiche le segnalazioni relative ai generi *Shigella*, *Yersinia*, *Aeromonas* e ad *Escherichia coli* VTEC.

Conclusioni. Il programma di sorveglianza si sta dimostrando uno strumento importante per monitorare l'epidemiologia dei batteri enteropatogeni nella nostra Regione grazie al contributo delle strutture sanitarie presenti sul nostro territorio. Lo studio dell'antibioticoresistenza ha rivelato un'importante diffusione sul territorio di ceppi di *Salmonella* multiresistenti che, oltre a ribadire l'importanza del monitoraggio epidemiologico, evidenziano la necessità dell'utilizzo di sistemi d'indagine molecolare sia per la tipizzazione che per la caratterizzazione genotipica delle resistenze.

067

EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI FUNGINE DELLA CUTE E DEGLI ANNESSI NEL PERIODO 2000-2006: STUDIO RETROSPETTIVO.

Passera M.¹, Raglio A.¹, Vailati F.¹, Di Landro A.², Imberti G.², Ghilardi A.¹, Goglio A.¹.

¹ Microbiologia e Virologia,

² Dermatologia, Ospedali Riuniti di Bergamo.

Introduzione. I funghi che causano infezioni superficiali e cutanee vengono generalmente raggruppati perché colpiscono le medesime aree del corpo: cute, capelli e unghie. Le micosi superficiali sono infezioni non invasive che colpiscono solo gli strati più superficiali cheratinizzati della cute e dei capelli. Le micosi cutanee sono dovute a funghi che colpiscono gli strati più profondi dell'epidermide, provocando in tal modo una maggiore distruzione dei tessuti e quindi una maggiore sintomatologia.

Obiettivo. Lo studio di carattere retrospettivo intende analizzare tutti i campioni di cute ed annessi cutanei pervenuti nella USC di Microbiologia e Virologia degli Ospedali Riuniti di Bergamo negli anni 2000-2006 per valutare la prevalenza di queste infezioni fungine e la frequenza di distribuzione nei materiali delle differenti specie in relazione anche ai fenomeni immigratori ed emigratori.

Metodi. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad esame microscopico diretto con KOH al 10% e Blu di lattofenolo, semina su agar Taplin ed agar Sabouraud con incubazione a temperatura ambiente per 4 settimane. Le colture positive sono state poi valutate macroscopicamente e, se necessario ai fini dell'identificazione, sottoposte a subcolture su agar Patata per i miceti filamentosi e a prove biochimiche (API 20 C AUX, bioMerieux) per i lieviti.

Risultati. Nel periodo 2000-2006 sono pervenuti nel nostro laboratorio 972 campioni per la ricerca dei miceti con una media/anno di 139 (SD ± 20), i campioni positivi sono stati 340 che rappresentano complessivamente il 35% del totale. La distribuzione degli isolati risulta così suddivisa: dermatofiti 129 (38%), lieviti 118 (35%), muffe varie 57 (17%) ed aspergilli 36 (10%). I dermatofiti sono rappresentati rispettivamente da *Trichophyton* spp. nell'89% e *Microsporum* spp. nell'11% mentre i lieviti da *Candida* spp. nel 94% dei casi. Si osservano con più frequenza le localizzazioni a livello delle unghie in 310 casi (91%) seguite dalle squame cutanee/capelli in 30 casi (9%). L'incidenza per sesso è più elevata nelle femmine 62% rispetto ai maschi 38%. La distribuzione degli isolamenti di miceti in base alla nazionalità mostra un progressivo aumento tra la popolazione degli extracomunitari dal 2% nel 2000 al 14% nel 2006.

Conclusioni. Allo stato attuale, una competenza sempre più accurata è richiesta ai Laboratori di Microbiologia anche nella diagnostica delle infezioni fungine che rispetto ad altri settori di questa disciplina è ancora legata all'utilizzo di metodiche tradizionali come l'esame macroscopico e microscopico.

068

EPIDEMIOLOGIA DELLE CANDIDOSI DISSEMINATE: ESPERIENZA DI UN OSPEDALE ROMANO NEL BIENNIO 2005-2007

Bossa M.C.², Minelli S.², Fontana C.^{1,2}, Favalli C.^{1,2}.

¹ Dipart. Medicina Sper. e Sc. Biochimiche, - Università Tor Vergata - Via Montpellier 1, 00133 Roma

² Lab Microbiologia, - Policlinico Tor Vergata - V.le Oxford 81 - 00133 Roma

Introduzione. I miceti del genere *Candida* sono stati responsabili, nelle ultime decadi, di un'aumentata incidenza di infezioni, in particolare nei pazienti immunocompromessi. Ciò ha reso necessaria l'introduzione di nuove molecole antifungine, che hanno largamente contribuito al trattamento di queste infezioni.

Scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare la prevalenza e la farmacoresistenza delle specie di *Candida* isolate dal sangue dei pazienti ricoverati presso il nostro Policlinico.

Metodi. I campioni, alloggiati nel sistema Bactec (BD), sono stati coltivati su terreni selettivi e non, e incubati per 24-48 ore a 37° ed a 25°C. Le identificazioni e gli antibiogrammi sono stati eseguiti mediante sistemi automatici e manuali (Vitek2 e ATB Expression, Biomerieux). I risultati sono stati trasferiti in un unico database (Vigi@ct) che raccoglie notizie anamnestiche di tutti i degenti. Tutti gli isolati sono stati saggiati verso i seguenti antimicotici: amphotericina B, fluconazolo, itraconazolo, ketoconazolo, 5-fluoro-citosina, voriconazolo.

Risultati e conclusioni. Le emocolture pervenute nel nostro laboratorio da maggio 2005 a maggio 2007 sono state 30.121, di cui 3841 sono risultate positive (12,75 %). 77 colture appartenevano al genere *Candida* (il 2,0 % degli isolati). La specie predominante è stata *Candida albicans* (44 campioni; 57,14%), seguita da *C. parapsilosis* (14 campioni; 18,18%), *C. tropicalis* (8 campioni; 10,39%), *C. glabrata* (6 campioni; 7,79%). Altre specie di *Candida*, *Saccharomyces* e *Cryptococcus* sono state isolate nei rimanenti 5 casi. Gli isolati sono stati riscontrati più frequentemente in pazienti ricoverati nei reparti di medicina (40,2 %), terapia intensiva (29,8 %) ed ematologia (10 %), in accordo con quanto descritto in letteratura circa i fattori di rischio (trattamento prolungato con antibiotici ad ampio spettro, introduzione di cateteri venosi, nutrizione parenterale, lungodegenza, stato di immunodepressione, neutropenia). Tra le molecole testate, l'amphotericina B ha mostrato range di sensibilità in tutti i ceppi di *Candida*. Anche con gli azoli si sono ottenute in vitro alte percentuali di sensibilità, ad eccezione dell'itraconazolo.

069

CANDIDOSI ORALE.

Gatti 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. Tra le malattie frequentemente riscontrate nella pratica della medicina orale, la candidosi orale rappresenta, di certo, la più comune. *C.albicans* è la specie maggiormente isolata dal cavo orale, quantunque le specie non albicans siano oggi sempre più identificate ed implicate in quadri clinici sia singolarmente che in associazione con *C.albicans*. 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 55 tamponi della mucosa orale e/o del palato di 55 partecipanti, suddivisi in due gruppi: gruppo I comprendente 22 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 Chromoagar (Alfa-Was.) e incubati a 37°C per quattro giorni. Le colonie cresciute venivano identificate mediante test di filamentazione e API 20C AUX (bioMérieux). L'antimicogramma è stato effettuato su piastre di RPMI utilizzando strisce Etest (Biolife) di Itraconazolo, Fluconazolo, Ketoconazolo e Voriconazolo.

Risultati. Hanno evidenziato che il 40% del campione totale era positivo nei confronti dei miceti del genere *Candida* e il 60% era negativo. Nel gruppo I i pazienti positivi erano il 45% e sono state identificate le specie: *C. albicans*, *C.parapsilosis* 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*. Etest ha dimostrato una bassa MIC per voriconazolo (0.004-0.125 µg/ml) e itraconazolo (0.016-0.5 µg/ml) su tutti i ceppi, mentre fluconazolo e ketoconazolo sono risultati resistenti in 4 ceppi di *C.albicans* e *C. parapsilosis* (MIC > 64 µg/ml).

Conclusioni. *C.albicans* è risultata la specie più isolata anche in campioni che proponevano fattori di rischio sistemici o locali. La comprensione e l'identificazione dei fattori predisponenti locali e sistemici all'infezione orale da *Candida spp.* fornisce all'operatore sanitario un indispensabile ausilio nella prevenzione. Si ritiene fondamentale tracciare e seguire un protocollo diagnostico, valutando la presenza dei fattori di rischio e procedendo alle indagini diagnostiche per l'identificazione del fungo e relativo antimicogramma al fine di poter predisporre un corretto management della infezione.

070

H₂S AGISCE SUL KILLING MACROFAGICO DI CANDIDA ALBICANS MODULANDO I LIVELLI DI GSH.

Grosso S., Lucini V., Pannacci M., Caronno A., Scaglione F.

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

Introduzione. Il solfuro d'idrogeno (H₂S), gas endogeno sintetizzato normalmente durante alcune reazioni metaboliche, svolge durante i processi infiammatori un'azione vasodilatatoria, in associazione all'ossido nitrico (NO), e da alcuni studi sembra proteggere le cellule neuronali dallo stress ossidativo modulando i livelli di ROS e di perossinitriti. Il meccanismo attraverso cui H₂S agisce a livello macrofagico è sconosciuto. Nel nostro studio abbiamo valutato la possibile correlazione esistente tra questa molecola, GSH e NO durante un'infezione da *C. albicans* in macrofagi murini dove lo stato ossidoriduttivo sembra essere responsabile della regolazione del killing intracellulare.

Metodi. Cellule J774A.1 infettate con *C. albicans*, vengono mantenuti per 60 min a 37°C in terreno contenente molecole modulatorie della sintesi di H₂S: sodio idrosulfide (NaHS) e DL-propargilglicina (PAG). Le *Candide* 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, la produzione di NO nei macrofagi infetti è stata determinata sia spettrofotometricamente che attraverso l'analisi dell'espressione di iNOS (NO-sintasi inducibile) mediante Real Time PCR.

Risultati. Macrofagi murini trattati con diverse concentrazioni di NaHS, precursore di H₂S, hanno evidenziato, a 60 minuti dall'infezione, un aumento dei livelli intracellulari di glutatione e un'inibizione della crescita fungina (85%). Il trattamento con PAG, inibitore specifico della sintesi di H₂S, ha diminuito invece la concentrazione di GSH e il killing intracellulare (~ 40%). NaHS ha significativamente ridotto l'espressione di iNOS e la conseguente produzione di NO mentre PAG stimolando la sintesi ha determinato un aumento di NO circolante (P<0.001).

Conclusioni. Il solfuro d'idrogeno sembra, quindi, modulare all'interno di macrofagi murini, il killing di *C. albicans* mediante l'aumento dei livelli intracellulari di GSH e l'inibizione della sintesi di ossido nitrico.

071

FARMACI ANTIFUNGINI E TEST DI SENSIBILITÀ IN VITRO

Giglio S., Iritano N., Saraceno R., Focarelli V., Rondinelli V., Colosimo M., Astorino G., Costa L., Samà S., De Fazio E., Tallarico K., Masciari R.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia
Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio Catanzaro

Introduzione. Nei reparti di Terapia Intensiva le infezioni di origine fungina stanno acquistando sempre maggiore rilevanza. Quelle sostenute da *Candida albicans* sono le più frequenti e rappresentano la conseguenza della immunocompromissione dei pazienti e delle prolungate terapie antibiotiche. In questi ultimi anni è emerso il problema della scelta appropriata della profilassi e della terapia antimicotica. Due diversi kit sono stati utilizzati per testare la sensibilità in vitro di questo micete.

Materiali e metodi: Abbiamo esaminato tamponi faringei, uretrali, urine ed emocolture provenienti da 20 pazienti della Rianimazione.

L'identificazione di *Candida albicans* è stata effettuata in automatico con il sistema ID 32 C (bioMérieux); l'antimicrogramma è stato effettuato sia con il kit ATB Fungus 3 (bioMérieux) che con il sistema Sensititre-Yeastone (Trek). Entrambi testano Amfotericina B, Fluconazolo, Itraconazolo, Fluorocitosina, Voriconazolo; il Sensititre anche il Ketoconazolo.

Risultati. L'ATB Fungus 3 evidenzia la costante sensibilità dei ceppi di *Candida albicans* alla Fluorocitosina (MIC < 4 µg/ml); un solo caso (emocoltura) di resistenza all'Amfotericina; la costante resistenza a Fluconazolo (MIC > 32 µg/ml), Itraconazolo (MIC > 4 µg/ml) e Voriconazolo (MIC > 8 µg/ml). Anche il sistema Sensititre evidenzia la costante sensibilità di *Candida albicans* alla Fluorocitosina mentre per l'Amfotericina prevede MIC mediamente di 5 µg/ml. La resistenza a Fluconazolo, Voriconazolo e Ketoconazolo è costante ed in due soli casi (tamponi faringei) si apprezza la sensibilità ad Itraconazolo. Con entrambi i kit non si osservano differenze significative di sensibilità del micete, rilevato nei vari distretti corporei dello stesso paziente.

Conclusioni. I dati ottenuti con i due kit non sono del tutto sovrapponibili e dimostrano la difficoltà nella scelta della terapia antimicotica, la necessità di una maggiore standardizzazione dei test di sensibilità e di una ottimizzazione della correlazione in vitro/in vivo. Infatti valori bassi o alti di MIC possono non essere sinonimi di successo o insuccesso della terapia.

072

MALARIA DA IMPORTAZIONE NEL NORD-EST: PRESENTAZIONE DI CASISTICA TRIENNALE

Arzese A.^{1,2}, Beltrame A.¹, Piazza M.¹, Fabbro E.¹, Rorato G.¹, Negri C.¹, Zamparini E.¹, Viale P.¹

¹Clinica di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliero-Universitaria Udinese (AOUD), 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. La malaria detiene il terzo posto tra le malattie infettive a livello mondiale (oltre 1 miliardo di soggetti), e nell'area tropicale e sub-tropicale costituisce una delle cause più frequenti di morbosità e mortalità. L'OMS stima un'incidenza di 300-500 milioni di nuovi casi/anno, di cui il 90% concentrati in Africa. La malaria, non più endemica in Italia da circa 40 anni, è oggi la più comune malattia d'importazione.

Si riporta la casistica registrata presso la Clinica di Malattie Infettive dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Udinese (AOUD) nell'ultimo triennio.

Metodi. Dal maggio 2004 al maggio 2007 su soggetti afferenti alla Clinica di Malattie Infettive o valutati in consulenza da vari reparti e servizi dell'AOUD, veniva effettuata indagine microbiologica secondo algoritmo clinico-diagnostico concordato sino a completamento del follow-up terapeutico; per diagnosi di malaria veniva applicato protocollo standard (colorazione di Giemsa su set di striscio sottile + goccia spessa), con integrazione mirata di saggio complementare di ricerca diretta di Ag plasmodiali (ICT/RDT).

Risultati. Sono stati accertati complessivamente 40 casi di malaria, esclusivamente di importazione, la cui etiologia risultava così distribuita: *P. falciparum* (37 casi), *P. vivax* (2 casi), *P. ovale* (1 caso). Il continente di importazione era prevalentemente l'Africa (90%); 33/40 soggetti erano extra-comunitari, 6/40 italiani, 1/40 di nazionalità U.S.A.; in 5/40 casi si trattava di soggetti in età pediatrica provenienti da paesi africani. Dall'anamnesi raccolta risulta che 8/40 soggetti avevano effettuato chemioprophilassi, di cui solo in 5 casi completata al rientro. In un caso si registrava la forma complicata di malaria da *P. falciparum*, con esito fatale.

Conclusioni. La problematica della malaria è presente nel nord-est con caratteristiche analoghe a quanto evidenziato a livello nazionale; il fenomeno migratorio in attuale rapida espansione in quest'area deve mantenere costante l'attenzione medica e la necessità di coordinare l'approccio clinico e diagnostico per la massima efficacia di intervento.

073

DIAGNOSI DI UN CASO DI ANISAKIDOSI ESOFAGEA MEDIANTE PCR-RFLP.

Avellino P.¹, Farjallah S.², Di Giulio E.³, Farina C.⁴,
Milione M.³, Cipriani P.¹, Modiano D.¹, D'Amelio S.¹

¹ Department of Public Health Science,
Sapienza University of Rome, P.le Aldo Moro, 5,
00185 Rome, Italy.

² Unité de Recherche: Génétique, Biodiversité et Valorisation des
Bioressources UR/09-30, Institut Supérieur de Biotechnologie de
Monastir, Monastir 5000, Tunisia.

³ Department of Digestive and Liver Disease, University
"La Sapienza", Ospedale Sant'Andrea, Via di Grottarossa 1035,
00189, Roma, Italy

⁴ Ospedale Israelitico, Via Fulda 14, 00148 Rome, Italy

Introduzione. I Nematodi dei generi *Anisakis* e *Pseudoterranova* sono i principali agenti eziologici dell'anisakidosi, una patologia dell'uomo contratta attraverso il consumo di pesce crudo o poco cotto. La sintomatologia clinica è correlata alle lesioni a livello gastrointestinale. A partire dal primo caso di anisakidosi, riportato in Olanda nel 1960, il numero dei casi in Europa e negli U.S.A. ha registrato un significativo aumento. In Italia, negli ultimi anni, sono stati segnalati diversi casi di anisakidosi, effettivamente accertati attraverso indagini parassitologiche. Recenti studi di PCR-RFLP condotti sull'rDNA nucleare hanno portato all'individuazione di marcatori molecolari specie-specifici che sono stati utilizzati per la prima volta nella diagnosi di un caso di anisakidosi gastrica in Italia.

Metodi. Nel presente studio è stata identificata attraverso PCR-RFLP una larva di *Anisakis* di tipo I, prelevata in endoscopia dall'esofago di una donna di 49 anni. Nell'analisi RFLP sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione *HinfI* e *HhaI*, come descritto da D'Amelio S et al, 2000.

Risultati. I profili di digestione hanno portato all'identificazione della larva come *Anisakis pegreffii*, coerentemente con l'evidenza che questa specie di *Anisakis* risulta essere la più diffusa nel Mediterraneo.

Conclusioni. Il presente studio rappresenta il secondo caso umano di anisakidosi in Italia diagnosticato attraverso un approccio molecolare. In Giappone, dove l'anisakidosi costituisce un problema sanitario ed economico molto importante, è stato effettuato uno studio su larga scala, basato sugli stessi marcatori genetici, ed è stato dimostrato che la maggioranza dei casi di anisakidosi in quest'area sono dovuti alla specie *A. simplex* s.str. In conclusione, considerando che larve della specie *A. pegreffii* sono diffuse in molte specie di pesci nei mari italiani e che il consumo di pesce crudo sta diventando sempre più comune, è probabile che in Italia l'incidenza di questa zoonosi parassitaria sia sottostimata.

074

SOLO...ASCARIS LUMBRICOIDES?

Cainarca M., Battaglioli L., Baccalini R., Tarricone C.,
Grimaldi C., Menni S.*, Boccardi D.*, Melzi d'Eril G.V.*

*Dipartimento di Medicina Chirurgia e Odontoiatria
Università degli Studi di Milano, Milano

U.O. Laboratorio di Analisi, Azienda Ospedaliera San Paolo,
Via di Rudinì 8, 20142 Milano.

*Istituto di Dermatologia, Università degli Studi di Milano, Milano

Introduzione. K.A. maschio di 6 anni, nato in Italia da genitori provenienti dal Senegal. Il bambino soggiorna in Senegal per lunghi periodi nel corso dell'estate. Dall'età di 9 mesi è in trattamento con varie terapie per dermatite atopica e, dall'età di un 1 anno soffre di crisi di asma bronchiale. Al momento del ricovero presso la U.O. Dermatologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria San Paolo di Milano l'obiettività cutanea era la seguente: agli arti superiori, inferiori e in regione scapolare si osservavano lesioni nodulari di di 3-6 mm di diametro, bruno-rossastre, alcune ricoperte da croste sierose ematiche. Al dorso delle gambe i noduli erano raggruppati a formare ampie placche. Venivano richiesti esami di laboratorio tra cui l'esame copro-parassitologico (ECPS).

Materiali e metodi. L'ECPS è mirato all'individuazione di tutti i protozoi patogeni, non di pertinenza umana e alla ricerca delle uova o larve di tutti gli elminti. Consiste nella valutazione macroscopica e microscopica (sia in soluzione salina che iodata) che dopo arricchimento dei campioni fecali (Midi Parasep Faecal Parasite Concentrator DID).

Risultati. al microscopio solo uova non fecondate di *Ascaris lumbricoides*...luciole o lanterne? Le misurazioni (50x80-90µm) risultavano pertinenti. Veniva richiesto un nuovo campione fecale e nell'ECPS successivo si riconfermava il risultato. Dal clinico sono stati inoltre richiesti: il prick test alle graminacee ++, Derm farinae ++, Derm Pteronyssimus ++, il dosaggio delle IgE pari a 8120 U/mL ed un emocromo con formula (eosinofilia 13%). In più la diagnosi istologica su prelievo di nodulo cutaneo era di "prurito nodulare".

Conclusioni. il bambino viene trattato con mebendazolo 100 mg per os X 3 giorni. Ad ulteriore controllo l'ECPS ha dato risultato negativo, le macchie mostrano regressione notevole e non si riscontrano, nonostante la stagione tardo primaverile segni di sofferenza bronchiale. Il bimbo verrà seguito per ulteriori controlli anche dopo il consueto soggiorno estivo nel Senegal. Cosa ci riporterà?

075

VALUTAZIONE DEI SAGGI VIDIA™ TOXOPLASMOSI IgM /IgG.

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

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

Obiettivo. In questo studio è stata valutata la “performance” clinica dei nuovi saggi VIDIA Toxo IgM/IgG a confronto con quella dei sistemi VIDAS (BioMérieux), AXSYM (Abbott) e LIAISON (DiaSorin) per la rivelazione degli anticorpi IgM e IgG anti *Toxoplasma gondii* utilizzando campioni clinici in uno studio di tipo retrospettivo e prospettico.

Materiali e metodi. Nel corso dello studio sono stati saggiati con tutti e 4 i sistemi contemporaneamente, 405 campioni di siero: 204 pervenuti presso il nostro laboratorio nel periodo 2005-2006 e congelati al momento del loro arrivo (studio retrospettivo) e 201 pervenuti nell'anno 2006 e saggiati al momento del loro arrivo o il giorno successivo (studio prospettico). Questi campioni appartenevano rispettivamente a: 243 donne in gravidanza, 6 donne in gravidanza con infezione da HIV, 39 individui adulti sani, 31 bambini, 71 pazienti immunocompromessi e 15 donatori di sangue.

La sensibilità e la specificità dei saggi VIDIA Toxo IgM/IgG è stata determinata in confronto ai sistemi VIDAS (attualmente utilizzato nel nostro laboratorio), AXSYM e LIAISON tenendo conto dei risultati positivi, negativi, falsi positivi e falsi negativi ottenuti. I campioni di siero per i quali è stato ottenuto un risultato dubbio (sia per IgM che per IgG, anche dopo la ripetizione dell'indagine) con qualsiasi dei 4 sistemi in studio, sono stati esclusi dall'analisi in quanto non possono essere considerati né positivi né negativi.

Risultati. Per quanto riguarda gli anticorpi IgM la sensibilità è risultata essere pari al 100% per i sistemi VIDIA e VIDAS, e all'82.35% e al 94.12% per i sistemi AXSYM e LIAISON, rispettivamente e la specificità è risultata essere pari al 100% per i sistemi VIDIA, VIDAS e LIAISON e al 99.73% per il sistema AXSYM. Per quanto riguarda gli anticorpi IgG la sensibilità è risultata essere pari al 100% per tutti e quattro i sistemi in studio e la specificità è risultata essere pari al 100% per i sistemi VIDAS e LIAISON e al 99.25% e 98.49% per i sistemi VIDIA e AXSYM.

Conclusioni. Nel nostro studio il sistema VIDIA per la rivelazione di anticorpi anti *Toxoplasma gondii* ha mostrato un'eccellente sensibilità e una buona specificità e si è rivelato essere anche di semplice e rapida esecuzione.

076

È IL SUINO UN SERBATOIO NATURALE DI *DIENTAMOEBA FRAGILIS*, CAUSA DELLA DIENTAMOEBIASI UMANA?

Crotti D.*, Manuali E., Crotti S., Venditti G., Salamida S., Sensi M.

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

* Libero Professionista in Parassitologia e Microbiologia Medica,
Perugia

Introduzione. Casuali osservazioni precedenti ed alcune affinità che legano il suino all'uomo ci hanno indotto a verificare il potenziale ruolo di questo animale quale serbatoio naturale di *Dientamoeba fragilis*, che tuttora è il protozoo di più frequente riscontro nelle infezioni sintomatiche e asintomatiche dell'uomo a livello intestinale.

Metodi. Nel corso del 2006-07 sono stati esaminati i campioni fecali di 215 suini di svariati allevamenti (sia a ciclo aperto che a ciclo chiuso) della provincia di Perugia. Trattavasi di 76 scrofe, 60 individui all'ingrasso, 37 magroncelli e 42 capi misti. Parte dei campioni fecali sono stati prelevati direttamente dall'ampolla rettale, parte dal suolo, appena emessi. Tutti i campioni sono stati quanto prima fissati in metanolo e colorati con il Giemsa (al 10% per 30'), quindi osservati al M. O. in immersione al 100x. Una parte di ciascun campione fecale è stata anche analizzata per un esame parassitologico standard ed una parte congelata per future tipizzazioni molecolari.

Risultati. *D. fragilis* è stata osservata in 105 campioni, pari al 48.8%. La più alta frequenza di reperimento è stata osservata nei soggetti giovani; infatti nelle scrofe è stata reperita nel 32.9% dei casi, nei suini all'ingrasso nel 61.7%, nei magroncelli nel 64.9% (tra i capi misti nel 45.2%). Spesso sono stati reperiti altri protozoi, in particolare *Iodamoeba buetschlii* e *Blastocystis hominis*, sia in associazione tra loro sia in associazione con *D. fragilis*; *Balantidium coli* fu osservato in un numero più contenuto di casi, così come gli elminti, essenzialmente ascaridi e strongili del suino.

Conclusioni. *D. fragilis* è presente nella popolazione suina con frequenze elevate. E' più spesso binucleata, ma si presenta anche mononucleata; le dimensioni sono variabili da 5-6 µm a oltre 20 µm; con il Giemsa il citoplasma si colora in azzurro (con tonalità variabili) ed il nucleo, mai compatto e talora frammentato, in rosso-rosso scuro. Gli studi biomolecolari dovrebbero confermare tale stato di cose. In ogni caso ed indipendentemente dal ruolo che *D. fragilis* possa svolgere nel suino (e sicuramente da studiare nel futuro), riteniamo assai suggestivo ipotizzare questo animale come un probabile serbatoio umano di tale protozoo.

077

TOXOPLASMOSI MATERNO FETALE: DATAZIONE DELL'INFEZIONE E FOLLOW-UP NEONATALE

Greco F., Tenuta R., Savino O., Lo Bianco A.M., Spadafora M., Orrico F., Gallo M., Noto A., Giraldi C.

Microbiologia e Virologia, Ospedale Annunziata, AO Cosenza

Introduzione. L'infezione da *T. gondii*, in gravidanza, può trasmettersi al feto con percentuali di rischio di infezione e/o malattia diverse e dipendenti dal periodo gestazionale in cui la madre si è contagiata. La finalità del nostro studio è stata quella di eseguire una corretta diagnosi sierologica nelle madri allo scopo di definire appropriate terapie ed un corretto follow up neonatale per prevenire le gravi sequele dell'infezione congenita.

Metodi. Nel periodo 2004-2006, 33 coppie di madri/figli sono state seguite con il seguente approccio: a) counseling per valutare il rischio fetale in relazione all'epoca gestazionale di infezione, diagnosi prenatale, opzioni terapeutiche e sorveglianze ecografiche, b) follow up sierologico e clinico-strumentale di tutti i nati fino al primo anno di vita. Nella diagnosi di infezione materna sono stati utilizzati i seguenti test: IgG, IgM, IgG-avidità CLIA (Diasorin) e ricerca del DNA-Toxoplasma su liquido amniotico mediante PCR *nested* (Nanogen). Nello screening neonatale la ricerca delle IgG ed IgM è stata eseguita mediante tecniche CLIA (Diasorin), ISAGA (Biomereux) e Western Blot (Effegiemme) comparate alla risposta sierologica materna.

Risultati. 33 neonati sono stati sottoposti a follow-up sierologico e clinico-strumentale per un anno. Le madri dei bambini, durante la gravidanza, sono state sottoposte a terapia secondo le comuni raccomandazioni.

Complessivamente solo cinque bambini sono risultati infetti ed in particolare: a) n. 1 infetto / n.14 sani, b) n.3 infetti/ 15 sani, c) n.1 infetto, rispettivamente nati da madri con infezione contratta nel primo (a), secondo (b) e terzo (c) trimestre. I cinque neonati all'anno di età erano apparentemente sani.

Conclusioni. Il follow up sierologico nei neonati nati da madri con infezione da *T. gondii* in gravidanza deve essere molto accurato soprattutto nei primi sei mesi di vita ed eseguito con tecniche di rilevazione anticorpale in ISAGA, EIA o CLIA e in Western Blot contemporaneamente al dosaggio degli anticorpi materni, al fine di anticipare la diagnosi di infezione congenita normalmente ottenuta con il rebound anticorpale e per impostare un corretto approccio terapeutico. Nella nostra esperienza, nessun bambino infetto, nato da madri sottoposte a terapia appropriata, ha mostrato segni di malattia.

078

VALUTAZIONE DI UN TEST AUTOMATIZZATO PER ANTICORPI ANTI- *T. PALLIDUM* E SIEROPREVALENZA IN ITALIA

Galli C.¹, Petasecca P.² per il GISSIL³

¹Abbott Diagnostici, Roma;

²Laboratorio Analisi, Istituto Dermatologico dell'Immacolata, Roma;

³Gruppo Italiano per lo Studio della Sierologia dell'Infezione Luetica

Introduzione e scopo del lavoro. Uno studio multicentrico ha valutato le caratteristiche di prestazione di un test automatizzato per la ricerca di anticorpi anti-*Treponema pallidum* e verificato la prevalenza di detti anticorpi in soggetti a diverso rischio d'infezione.

Metodi. Presso 22 laboratori in 8 regioni italiane (14 Centri trasfusionali, 3 Microbiologie e 5 Laboratori analisi) sono stati analizzati campioni di routine ottenuti da: 1) donatori di sangue (D); 2) soggetti a basso rischio (LR); 3) soggetti ad alto rischio (HR); 4) casi clinici di sifilide. I campioni sono stati testati con il test Architect Syphilis, un metodo automatizzato in chemiluminescenza che utilizza 3 antigeni ricombinanti di *T. pallidum* (TP15, TP17, TP47) sulla fase solida. Su molti campioni sono stati utilizzati anche altri test treponemici (TP: EIA, TPHA/TPPA, FTA-Abs, WB) o non treponemici (NT: VDRL, RPR). In accordo con le linee guida esistenti, i campioni reattivi con almeno due test treponemici sono stati considerati positivi.

Risultati. Sono stati raccolti complessivamente oltre 62.000 campioni di routine, di cui 44.889 D (prevalenza: 0,15%), 16.082 LR (3,46%), 684 HR (16,9%) e 386 pazienti luetici. In questi ultimi, i test treponemici avevano sensibilità equivalente nelle forme primarie e secondarie (Architect lue: 100% e 99,4%), mentre i test reaginici avevano una sensibilità del 96,2% nelle forme primarie e secondarie e solo del 17,4% nelle latenti. La concordanza tra il test Architect ad altri 4 test immunoenzimatici, valutata su 7.844 campioni, era del 99,5%, la specificità sui donatori 99,65%.

Conclusioni. La prevalenza di anticorpi anti-*T. pallidum* nella popolazione a basso rischio in Italia appare in aumento, come recentemente segnalato. La maggior parte dei casi sono rappresentati da infezioni latenti, nelle quali la sensibilità dei test reaginici è bassa. La specificità e, soprattutto, la sensibilità del test Architect Syphilis sono apparse adeguate per un utilizzo in screening.

079

DUE NUOVI TEST DI CONFERMA LD BIO TOXO II IGG E IGM WESTERN BLOT PERMETTONO DI DISCRIMINARE TRA ANTICORPI SPECIFICI E ASPECIFICI NELLA DIAGNOSI DI TOXOPLASMOSI IN GRAVIDANZA

Genco F., Lanzarini P., Meroni V.

Dipartimento di Malattie Infettive, Università di Pavia
Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico "San Matteo"
Via Taramelli 5, 27100 Pavia Italy
E-Mail: v.meroni@smatteo.pv.it

Introduzione. Quando la primoinfezione da *Toxoplasma gondii* viene contratta durante la gravidanza può avere gravi conseguenze per il prodotto del concepimento. Nelle fasi iniziali gli anticorpi IgG sono in genere assenti e la sola presenza di IgM non può essere considerata diagnostica per la loro frequente aspecificità. La comparsa delle IgG può essere ritardata e ridotta dalla terapia somministrata in tutti i casi di positività IgM. In questo studio abbiamo valutato l'accuratezza diagnostica dei test western blot di conferma LDBIO TOXO II IGG e TOXO II IGM in 25 gravide negative per IgG e positive per IgM antitoxoplasma.

Pazienti e Metodi. Venticinque gravide negative per IgG anti-*Toxoplasma* (Etitoxok IgG DIASORIN Saluggia Italy, VIDAS toxo IgG II BIOMERIEUX Marcy l'Etoile, France) e positive per IgM con almeno uno dei due test Etitoxok-IgM DIASORIN Saluggia Italy e/o Toxo-IgMISAGA BIOMERIEUX Marcy l'Etoile, France, in terapia con spiramicina, sono state valutate con i test LDBIO-TOXO II IgG and LDBIO-TOXO II IgM (LDBIO DIAGNOSTICS, Lyon France) quest'ultimo non ancora disponibile in commercio. In 9 delle 25 pazienti sono stati effettuati anche test di stimolazione linfocitaria. In tutti i casi è stato effettuato un follow-up sierologico settimanale per evidenziare la sieroconversione.

Risultati. LDBIO-TOXO II IgM è risultato positivo in 12 pazienti. In 10 casi la sieroconversione è stata confermata dalla comparsa di IgG specifiche durante il follow-up. In tutte le sieroconversioni il test LDBIO TOXO II IgG ha evidenziato la comparsa degli anticorpi più precocemente dei test tradizionali. In 13 casi negativi non si è avuta sieroconversione anche dopo interruzione della terapia. In 2 casi il test LDBIO-TOXO II IgM è risultato falsamente positivo.

Conclusioni. In 23 pazienti il test LDBIO TOXO II IgM ha permesso una diagnosi corretta e precoce. Tutte le pazienti con sieroconversione sono state correttamente diagnosticate. Il test LDBIO TOXO II IgG in tutte le pazienti con infezione ha permesso di confermare la sieroconversione prima dei test tradizionali. In tutti i casi negativi è stato possibile interrompere la terapia e assicurare la donna.

080

GENOTIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *Entamoeba histolytica* IDENTIFICATI A PARMA: RISULTATI PRELIMINARI.

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

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

Introduzione. L'attuale conoscenza della patogenesi dell'amebiasi manca della comprensione di ciò che determina l'esito dell'infezione da *Entamoeba histolytica* (Eh). È possibile che uno dei fattori determinanti risieda nel genotipo del parassita.

Metodi. Nel presente studio abbiamo utilizzato un pannello di saggi di PCR aventi come bersaglio 6 loci contenenti "short tandem repeats" (STR), al fine di studiare la diversità genetica di ceppi di Eh identificati in 19 campioni (feci, aspirati da ascessi epatici, biopsie intestinali) appartenenti ad 8 pazienti con amebiasi (5 intestinale, 3 extraintestinale).

Risultati. Sulla base della variabilità nel numero di STR, tutti i ceppi di Eh di pazienti diversi presentavano genotipo differente (ad eccezione di 2 ceppi identificati nelle feci di 2 individui appartenenti allo stesso nucleo familiare), riflettendo un elevato grado di polimorfismo. Interessante è il caso dell'unico paziente del quale erano disponibili sia le feci sia l'aspirato da ascesso epatico: i ceppi di Eh nei 2 tipi di campioni avevano genotipi diversi. Tale osservazione suggerisce un possibile ruolo del genotipo nel determinare un tropismo di tessuto, ipotesi che certamente necessita di una conferma su un numero significativo di individui con amebiasi extraintestinale. È in corso il sequenziamento dei prodotti di amplificazione per confermare l'assegnazione dei genotipi, condotta in prima istanza sulla base della stima delle dimensioni degli ampliconi in gel di agarosio.

Discussione. Un recente studio svolto in Bangladesh ha suggerito che il genoma di Eh possa rivestire un ruolo nel determinare l'esito dell'infezione. Per confermare tale osservazione è necessaria un'estensiva raccolta di campioni in differenti aree geografiche del mondo. Pertanto, sebbene non si riferiscano ad una vasta popolazione di ceppi, auspichiamo che i risultati del presente studio, quando analizzati unitamente a dati di genotipizzazione prodotti su un numero crescente di ceppi isolati da pazienti asintomatici e sintomatici, possano fornire un contributo per una più profonda comprensione dell'associazione tra genotipo di Eh ed esito dell'infezione.

081

ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* COMPLEX IN ULCERA CUTANEA DA PAZIENTE DI RITORNO DA SOGGIORNO NELLA FORESTA AMAZZONICA.

Grande R.¹, Maraschini A.¹, Torresani E.¹, Bottini S.², Lunardon L.², Gramiccia M.³

¹UO Laboratorio Centrale di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche - Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli, Regina Elena - Milano,

²Istituto di Scienze Dermatologiche - Università degli Studi di Milano,

³MIPI - Istituto Superiore di Sanità - Roma

Introduzione. P.E., di anni 50, in buone condizioni generali, veniva visitato presso il nostro ambulatorio per un'ulcera cutanea localizzata sul dorso della mano destra dalle dimensioni di circa 2 cm. di diametro di aspetto infiltrato. Il paziente riferiva un soggiorno di circa un mese nella Foresta Amazzonica al confine tra Bolivia e Brasile nell'Agosto 2006 e di esser stato sottoposto ad una serie di esami ematochimici, biotipici e colturali per ricerca batteri e miceti presso un'altra struttura sanitaria con esito negativo. Al momento della presentazione presso il nostro Ambulatorio il paziente non era stato sottoposto ad alcuna terapia e l'ulcera osservata non mostrava tendenza alla guarigione spontanea.

Materiali e Metodi. Il paziente veniva sottoposto a tamponamento cutaneo della lesione per ricerca di batteri e miceti e ad una nuova biopsia cutanea. Veniva quindi prelevato del materiale dal bordo della lesione e seminato in terreno bifasico NNN; una porzione del materiale prelevato veniva approntata su vetrino e colorata secondo Giemsa; il preparato colorato veniva osservato in microscopia ottica a 100x. Veniva effettuato un prelievo ematico per la sierologia specifica (Western Blot LD Bio e ricerca immunocromatografica anticorpi anti rK39 DID).

Risultati. La biopsia ha evidenziato un "quadro granulomatoso suggestivo di leishmaniosi cutanea". La lettura microscopica del preparato e gli esami colturali hanno dato esito negativo. La sierologia è risultata positiva alle bande specifiche per Western Blot e negativa alla ricerca per anticorpi anti rK39. L'esame colturale per *Leishmania* ha dato esito positivo al 6° giorno di osservazione. La coltura è stata quindi inviata presso l'Istituto Superiore di Sanità dove il lisato colturale è stato sottoposto a starch gel electrophoresis per lo studio di 13 isoenzimi; il ceppo è stato identificato appartenere a uno zimodema di *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex.

Discussione. La Leishmaniosi è una malattia parassitaria trasmessa all'uomo dalla puntura di un flebotomo. I quadri clinici sono multiformi e dipendenti dalla specie di protozoo coinvolto. Il nostro report sottolinea l'importanza del prendere in considerazione la Leishmaniosi cutanea nella diagnosi differenziale per ulcere cutanee di pazienti provenienti da area endemica e, soprattutto, l'importanza dell'esame colturale e della successiva diagnosi di specie per attuare una terapia congrua.

082

SVILUPPO DI SAGGI LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) PER LA DIAGNOSI DI *TOXOPLASMA GONDII*

Meroni¹ V., Putignani² L., Russo² C., Genco¹ F., Adlerstein³ D., Menichella² D.

¹Dipartimento di Malattie Infettive, Università di Pavia, Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico "San Matteo", Via Taramelli 5, 27100, Pavia.

²Unità di Microbiologia e Virologia, Ospedale Pediatrico e I.R.C.C.S. "Bambino Gesù", Piazza Sant'Onofrio 4, 00165, Roma.

³DiaSorin SpA Molecular Diagnostics, Via Crescentino SNC, I 3040 Saluggia (VC).

Introduzione. La toxoplasmosi è un'infezione a decorso generalmente lieve e asintomatico che può tuttavia generare gravi conseguenze se contratta da individui immunocompromessi o durante la vita fetale. E' fondamentale, pertanto, una diagnostica sensibile e specifica che permetta di individuare tempestivamente sia infezioni prenatali che disseminate tipiche del paziente immunocompromesso. Scopo dello studio è stata la progettazione di saggi LAMP (Loop-mediated isothermal AMPLification) e la loro applicazione alla rilevazione di *Toxoplasma gondii* in campioni clinici al fine di valutarne il potenziale diagnostico.

Metodi. I saggi LAMP sono stati disegnati su porzioni interne del gene multicopie B1 (25 copie) e della regione ripetuta RE (200-300 copie) del genoma di *T. gondii*, genotipo I, ceppo RH. Il saggio LAMP RE, è stato utilizzato per analizzare in triplicato 15 campioni clinici (liquidi amniotici e sangue periferico), precedentemente caratterizzati mediante metodiche diagnostiche di Real-Time PCR e Nested-PCR seguite da "follow-up" clinico-sierologico di validazione.

Risultati. Diluizioni seriali da 10.000 a 1 copia di DNA genomico hanno mostrato linearità fino a 10 copie per il saggio B1 e fino a 1 copia per il saggio RE. Per entrambi i saggi è stata riscontrata una specificità riproducibile. Quattordici dei 15 campioni clinici analizzati mediante LAMP RE hanno prodotto risultati concordanti con quelli ottenuti coi precedenti protocolli diagnostici. Solo in un caso, risultato negativo sia in Nested-PCR che Real-Time PCR, il saggio LAMP è risultato positivo su uno dei tre replicati eseguiti.

Conclusioni. I saggi LAMP possono costituire una valida alternativa alle attuali metodiche identificative basate su PCR per la diagnosi di toxoplasmosi in gravidanza e nel paziente immunocompromesso. Inoltre, l'elevata rapidità di esecuzione del saggio (40 min), unita alle caratteristiche di sensibilità e specificità, rendono i saggi LAMP un nuovo strumento di "routine" da inserire in algoritmi diagnostici per l'identificazione precoce di toxoplasmosi.

083

PREVALENZA DELLE PROTOZOOSI INTESTINALI IN PAZIENTI RICOVERATI PRESSO IL POLICLINICO UNIVERSITARIO FEDERICO II DI NAPOLI DAL 2001 AL 2006

Piccoli S., Avagliano G., Grisolia V., Maio F., Fiorentino I.,
Raiola R., Salza F., Lubritto G., Lamberti V., Piemonte M.,
Rossano F.

Dipartimento assistenziale di Patologia Clinica, Facoltà di
Medicina e Chirurgia, Università Federico II, Napoli

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 dati relativi agli anni 2001-2006 riguardanti le protozoosi intestinali di pazienti ricoverati presso il Policlinico della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università Federico II di Napoli

Metodi. Sono stati analizzati complessivamente per i 6 anni (2001-2006) 7.629 campioni di feci di pazienti pervenuti presso il laboratorio di Microbiologia. Ciascun campione è stato sottoposto ad esame macroscopico per evidenziare consistenza, presenza di sangue, muco e, ad esame microscopico a fresco e dopo arricchimento con metodo di Ritchie, per la ricerca di cisti e/o trofozoiti di protozoi.

Risultati. Dai campioni analizzati sono stati diagnosticati 375 (4.9%) casi di infezioni da protozoi intestinali sul totale di 7.629, di cui:

237 *Enteromonas hominis* (3%)

55 *Giardia intestinalis* (0.7%)

36 *Blastocystis hominis* (0.5%)

16 *Cryptosporidium* (0.2%)

4 *Entamoeba histolytica* (0.05%)

4 *Entamoeba coli* (0.05%)

23 *Dientamoeba fragilis* (0.3%)

Conclusioni. Va sottolineato che i risultati ottenuti sono riferiti ad esami parassitologici eseguiti routinariamente nella pratica clinica su tutti i pazienti ricoverati per patologie non strettamente legate ad infezioni da protozoi presso l'Università Federico II. In tal modo è stato possibile evidenziare la realtà epidemiologica degli ultimi sei anni nella area Universitaria di nostra competenza.

084

USO COMBINATO DI AFFIGENE CMV TRENDER E BIOROBOT MDX PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI CMV DNA

Abbate I.¹, Finnstrom N.², Garbuglia A.¹, Solmone M.C.¹,
Zaniratti S., Bennici E.¹, Neri S.¹, Brega .C.¹, Paterno M.¹
and Capobianchi M.R.¹

¹INMI L.Spallanzani, Rome, Italy,

²Sangtec, Bromma, Sweden

Introduzione. La determinazione quantitativa di CMV DNA nel sangue è di fondamentale importanza nella prevenzione della malattia da CMV nei soggetti con immunosoppressione. Scopo dello studio è stata la valutazione dell'uso combinato di un kit commerciale per la determinazione quantitativa di CMV DNA (CMV Affigene Trender, Sangtec) associata ad un sistema generico di estrazione degli acidi nucleici automatizzato (BioRobot MDx Workstation, Qiagen).

Materiali e Metodi. Per la valutazione è stato utilizzato il pannello CMV QCMD 2005 e campioni clinici di sangue intero, su cui è stata eseguita la PCR quantitativa con CMV Affigene Trender, una in house Nested PCR ed il test dell'antigenemia pp65.

Risultati. La media dei risultati quantitativi del CMV DNA, ottenuti per ciascun membro del pannello QCMD, non si discostava di più di 0.25 log dalla media riportata nel report, tranne che per 2 campioni i cui valori rimanevano comunque nel range dell'errore standard. I negativi sono risultati tutti negativi. I risultati ottenuti utilizzando Affigene CMV Trender si sono dimostrati in ottima concordanza con quelli ottenuti con la Nested PCR (0.97 di concordanza, $k=0.914$; IC 95% 0.818-1, $p<0.001$). La PCR quantitativa Affigene si è dimostrata anche in buon accordo con i dati dell'antigenemia pp65, $r=0.62$ $p<0.0001$, correlazione di Spearman. E' da sottolineare che circa l'8% dei campioni con antigenemia assente sono risultati positivi con la PCR Affigene.

Conclusioni. L'uso combinato dell'estrazione automatica con BioRobot MDx Workstation e di affigene CMV trender ha dato buoni risultati sia con il pannello del QCMD, sia sui campioni clinici. I risultati forniti dall'uso del CMV Affigene trender si sono ritrovati in buona concordanza sia con quelli ottenuti con la Nested PCR che con i risultati dell'antigenemia pp65, aprendo la possibilità di una veloce ed accurata determinazione anche in condizioni in cui è richiesta una elevata processività dei campioni.

085

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI BKV E JCV DNA CON AFFIGENE BKV TRENDER ED UNA IN HOUSE REAL-TIME PCR PER JCV ASSOCIATA ALL'USO DEL SISTEMA BIOROBOT MDX

Abbate I., Bennici E., Neri S., Brega C., Paterno M. and Capobianchi M.R.

INMI L. Spallanzani, Rome, Italy

Introduzione. La determinazione quantitativa di BKV e JCV DNA è importante nel monitoraggio dei trapiantati di rene. L'identificazione di valori di viremia di rilevanza clinica è ostacolata da problemi di standardizzazione dei metodi.

Scopo della studio è stato la valutazione dell'uso combinato di un kit commerciale per la determinazione quantitativa di BKV DNA e di una Real time PCR specifica per JCV, accoppiata ad un sistema automatizzato, generico, di estrazione degli acidi nucleici.

Materiali e Metodi. È stato utilizzato il pannello dello studio pilota per la determinazione quantitativa di genomi di BKV e JCV del QCMD 2007. I campioni sono stati estratti con il sistema automatico BioRobot MDx Workstation (Qiagen). Gli estratti sono stati amplificati per il BKV con un metodo commerciale (BKV Affigene Trender, Sangtec) e mediante una Real-time PCR in house per il gene VP1 di JCV.

Risultati. Il sistema di amplificazione Affigene BKV Trender è stato in grado di identificare tutti i campioni positivi di BKV e tutti i campioni doppiamente positivi per BKV e per JCV. Tutti i negativi sono stati correttamente identificati. È stata osservata una sovrastima delle concentrazioni di BKV genotipo 2.

La Real Time PCR per JCV ha correttamente identificato 7 degli 8 campioni positivi per JCV e tutti i campioni doppiamente positivi per BKV e per JCV. Un campione positivo per BKV è stato considerato positivo per JCV in modo aspecifico, mentre tutti i negativi sono stati correttamente identificati.

Dai dati di ciclo soglia forniti dal QCMD si è notata una sovrastima della concentrazione di JCV genotipo 2 ed una sottostima di quelli di genotipo 1.

Conclusioni. L'uso combinato dell'estrazione automatica con BioRobot MDx Workstation e di Affigene BKV Trender e della Real Time per JCV ha dato buoni risultati, anche se esistono differenze di quantizzazione dei diversi genotipi di questi poliomavirus.

086

BK VIRUS AND JC VIRUS COINFECTION IN A RENAL TRANSPLANT RECIPIENT

Astegiano S.¹, Costa C.¹, Bergallo M.¹, Sidoti F.¹, Terlizzi M.E.¹, Segoloni G.P.², Cavallo R.¹

¹Dept. of Public Health and Microbiology, Virology Unit, University of Turin

²Dept. of Internal Medicine Renal Transplant Unit Molinette Hospital Turin, Italy

Introduction. JC virus (JCV) was first isolated in a patient with progressive multifocal leukoencephalopathy. Most cases of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) in renal transplant recipients are caused by BK virus, however recent reports have evidenced a role for JCV, alone or in coinfection with BKV. We describe a case of ureteral lesions in a renal transplant recipient with a BKV/JCV coinfection.

Methods. Following renal transplantation, a 65-years-old woman evidenced deterioration of renal function and ureteral stenosis. PCR for BKV- and JCV-DNA on serum and urine samples and ureteral specimen was performed.

Results. On day 12 PCR was negative for serum and urine BKV DNA and serum JCV DNA, while a viruria of 10² JCV copies/ml was evidenced. On day 51 a pyeloureteral anastomosis was performed, evidencing ureteral stricture and detachment. Histological investigation evidenced cystic ureteritis and mild chronic inflammation. Neither nuclear findings consistent with viral infection nor positive reaction for SV40 antibody were present. PCR on ureteral specimen evidenced a viral load of 10³ BKV and 10⁸ JCV copies/μg of extracted DNA. Clinical conditions and allograft function worsened; transplantectomy was performed on day 65. Histological investigation of the explanted kidney disclosed acute microabscessual pyelonephritis due to *C. albicans*, a small infarction and cystic pyelitis. Notwithstanding immunosuppression withdrawal, transplantectomy, and anti-fungal therapy, the patient died on day 83. Autopsy was not performed.

Conclusions. It should be recommendable a close monitoring of Polyomaviruses DNA serum and urine levels in order to diagnose a viral reactivation in its early stages and the execution of a quantitative PCR on tissue samples. Clinical and pathogenic significance and the role of JCV in this context remain uncertain, as we cannot establish a correlation between the development of ureteral lesion and the PCR results on tissue specimen.

087

POLYOMAVIRUS BK IN KIDNEY BIOPSIES FROM TRANSPLANT RECIPIENTS

Astegiano S., Bergallo M., Costa C., Sidoti F., Terlizzi M.E., Cavallo R.

Dept. of Public Health and Microbiology, Virology Unit, University of Turin, Italy

Introduction. BK virus (BKV) is a human polyomavirus worldwide distributed (80% seroprevalence). Following primary infection, that usually occurs during childhood and seems to be asymptomatic, BK virus establishes latency, being the reno-urinary tract the epidemiologically most relevant latency site. Reactivation is common in renal transplant recipients and may cause polyomavirus-associated nephropathy (1-10%), with graft loss in up to 80% of the cases. Here we present the results of a study on detection of BK-DNA in renal biopsy specimens from renal transplant recipients.

Methods. Overall, 129 biopsies of 106 renal transplant recipients were evaluated. All the renal biopsies were performed for clinical indications and/or a clinical or laboratory suspicion of acute or chronic rejection. BKV-DNA was quantified by real-time PCR on paraffin-embedded tissue samples.

Results. Real-time PCR for BKV-DNA was positive in 39 of 129 transplant biopsies (30.2%), obtained from 31 of 106 patients (29.2%). BKV viral load was as follows: median, 59 copies/ μ g of extracted DNA; mean \pm standard deviation, 713586.7 \pm 2803386 copies/ μ g of extracted DNA; range, <40->4000000. Considering the occurrence of PVAN, a diagnosis was made (in the presence of deterioration in renal function and histopathologic findings characterized by typical viral cytopathic changes and staining for polyomavirus Large T antigen) in 2 patients (prevalence rate, 1.9%), both positive to BKV-DNA (viral load >4000000).

Conclusions. Our study confirms that the reno-urinary tract is a latency site of BK and the relatively high frequency in renal allograft tissue. The prevalence of PVAN was similar to that reported by other studies.

088

DIAGNOSI MOLECOLARE DELLE INFEZIONI VIRALI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Scalet G^{1,2}, Boaretti M^{1,2}, Fontana R.^{1,2}

¹Dipartimento di Patologia, Sez. di Microbiologia, Università di Verona

²Servizio di Microbiologia, Immunologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Verona

Introduzione. La sintomatologia e il decorso delle infezioni virali a livello del sistema nervoso centrale (SNC) non presentano elementi patognomici specifici: la differenziazione fra i vari agenti responsabili è quindi pressoché impossibile da un punto di vista clinico. Inoltre le tecniche convenzionali (colturali e sierologiche) spesso sono in grado di fornire diagnosi solo retrospettive. Una diagnosi tempestiva e in fase acuta della malattia risulta necessaria al fine di adottare una terapia adeguata in tempi rapidi. L'approccio diagnostico che risponde a tali esigenze è sicuramente rappresentato dalle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (PCR).

Metodi. Durante l'anno 2006 sono stati analizzati mediante PCR per l'evidenziazione di genomi virali 156 campioni di liquor; la ricerca ha riguardato i seguenti virus: Herpes Simplex virus (HSV) tipo 1 e 2, virus Varicella-zoster (VZV), virus di Epstein-Barr (EBV), Cytomegalovirus (CMV), Polyomavirus JC (JCV), Enterovirus, virus della rosolia, morbillo e parotite. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'accuratezza diagnostica della PCR nell'ambito delle infezioni virali del sistema nervoso. Non essendo disponibili in molti casi test "gold standard", abbiamo preso in considerazione i dati clinici e di laboratorio relativi al paziente al fine di classificare i casi in base alla probabilità di infezione virale del SNC nelle categorie: accertato, probabile, possibile, non possibile.

Risultati. Sono risultati positivi 14 campioni (9%), di cui 5 per HSV, 3 per Enterovirus e JCV, 2 per VZV e 1 per EBV. La sensibilità era del 100% in quanto tutti i casi accertati sono risultati positivi alla PCR; la specificità era del 95%. I nostri dati indicano che la diagnosi di un'infezione virale del SNC è 21 volte più probabile in un paziente con risultato positivo alla PCR che in uno con risultato negativo [LR+=21,29 CI (9,13-39)]; inoltre, come evidenziato in molti studi, un risultato negativo alla PCR deve essere comunque considerato dal clinico con una moderata cautela e non esclude la possibilità di un'infezione virale del SNC [LR -= 0.85 CI (0,79-0,94)].

Conclusioni. La PCR è una tecnica sicuramente vantaggiosa nella diagnosi delle infezioni virali del SNC per la sua specificità e rapidità; è necessario comunque avere a disposizione kit standardizzati che utilizzino tecniche di PCR Multiplex o Real-time così da aumentare ulteriormente la sensibilità, specificità e rapidità di tale tipo di test.

089

MONITORAGGIO VIROLOGICO IN PAZIENTI ONCOEMATOLOGICI NEGLI ANNI 2004-2007

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

Laboratorio Virologia Diretta
U.O.C. Microbiologia e Virologia
A.O. Policlinico - Bari

Le infezioni da Herpesvirus negli stati di immunodepressione rappresentano un grave problema sanitario dovuto al rischio concreto di malattia severa. Una peculiare caratteristica dei virus erpetici è infatti la capacità di stabilire nell'ospite, a seguito di un'infezione primaria più o meno acuta, infezioni persistenti tutta la vita, con frequenti riattivazioni a cui si associano gravi quadri patologici. Discriminante è lo stato immunitario che condiziona sia l'insorgenza che la gravità del processo infettivo: infatti i virus erpetici sono abili nell'evadere il sistema immunitario interagendo con cellule deputate alla risposta umorale o adattiva spesso già pesantemente inficiate dalla patologia di base di tali pazienti.

Nel corso degli anni 2004-2007 sono stati monitorati 39 pazienti (24 maschi, 15 femmine, range di età 1,5- 78), di cui 21 sottoposti a trapianto di midollo osseo, che presentavano disordini ematologici di varia natura: 14 affetti da LLA, 7 LNH, 4 LH, 4 MM, 2 LLC, 2 Linfoma Linfoblastico a Cellule T, 1 BLLC, 1 Linfoma K11, 1HLH, 1 LC, 1 LMA, 1MDS. I pazienti sono stati monitorati da un minimo di due ad un massimo di trenta volte nel corso della sorveglianza virologica che è stata condotta mediante tecnica PCR Real Time e nested per HSV1, HSV2, CMV, EBV, HHV7, HHV8, VZV su campioni ematici, accompagnati o meno da campioni pertinenti la patologia in atto. Dall'analisi virologica l'82% dei pazienti è risultato positivo per almeno uno degli otto virus erpetici ricercati eziologicamente associati a quadri di polmonite interstiziale, neutropenia, lesioni mucocutanee, encefalite e trasformazione neoplastica. Nelle malattie oncoematologiche la frequenza di infezioni virali è elevata a causa dello stato di neutropenia e immunosoppressione derivante dall'intensità del regime di condizionamento pre-trapianto: il riconoscimento dell'agente eziologico e la terapia mirata e precoce sono presidi salvavita resi oggi disponibili dall'utilizzo di tecniche molecolari.

090

CARATTERIZZAZIONE DEI PROFILI DI RESISTENZA A LAMIVUDINA ED ADEFOVIR IN PAZIENTI CON EPATITE B CRONICA

Capriello G.¹; Visca M.¹; Longo R.¹; Romano S.¹;
Bernassola M.¹; Gallinaro V.²; De Sanctis G.M.²; Trignetti M.³;
Gori C.⁴; Svicher V.³; Ceccherini-Silberstein F.³; Perno C.F.³;
Spano' A.¹

¹U.O.C. Microbiologia Virologia e Immunologia,
Ospedale "S. Per tini" - Roma

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

³Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche,
Università di Roma "Tor Vergata" - Roma

⁴I.N.M.I. "Lazzaro Spallanzani" - Roma

Introduzione. L'efficacia degli analoghi nucleos(t)idici per il trattamento dell'epatite B cronica è fortemente limitata dall'insorgenza della farmacoresistenza. Risulta pertanto fondamentale studiare i profili di resistenza verso tale classe di farmaci e la loro correlazione con i parametri virologici e clinici.

Metodi. Una coorte di pazienti (HIV-Ab/HCV-Ab negativi) con epatite B cronica (34 trattati con lamivudina e 9 con adefovir) è stata analizzata con PCR *Real-time* per la viremia e con sequenziamento diretto per il genotipo e la farmacoresistenza (Pol/RT). Il coefficiente di correlazione binomiale (ϕ) e la *cluster* analisi sono stati utilizzati per identificare correlazioni tra mutazioni.

Risultati. Il 95% dei pazienti è risultato con genotipo D, e il 5% con genotipo A. Dopo almeno due anni di trattamento con lamivudina, 32/34 pazienti presentavano mutazioni associate a resistenza.

La mutazione osservata più frequentemente era la L180M (N=25), seguita da M204I (N=18), M204V (N=16), L80I (N=8) e L80V (N=7).

La M204V risultava associata alla L180M ($\phi=0.56$, $p<0.001$). La co-presenza delle mutazioni L80I/V con il *cluster* M204V+L180M era associata ad un aumento di 2 log di viremia (3.3 versus 5.1) e ad un aumento di 3 volte dei valori di ALT (34UI/ml versus 96UI/ml). La M204I mostrava un *trend* di correlazione positiva con la L80I ($\phi=0.24$, $p=0.1$) e un'associazione negativa con la L180M ($\phi=-0.56$, $p<0.001$), come confermato dalla riduzione della viremia nei pazienti M204I+L180M rispetto ai pazienti M204I+L80I/V (3.3 versus 4.7).

La mutazione V173L è stata riscontrata in un paziente con genotipo A, insieme con L80I+L180M+M204I.

Dopo almeno un anno di trattamento con adefovir, in 6/9 pazienti sono stati individuati i seguenti profili: A181T/V+N236T (N=3), A181V (N=2), A181V+V173M (N=1).

Conclusioni. Tale studio mostra la complessità e la varietà dei profili di resistenza verso lamivudina ed adefovir e sottolinea l'importanza di sequenziare l'intera Pol-RT di HBV per una loro migliore caratterizzazione. Ciò è importante per una corretta impostazione delle strategie terapeutiche antivirali.

091

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ROTAVIRUS INFECTION IN HOSPITALIZED CHILDREN

Carraturo A., Catalani V., Tega L.

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

Introduction. Acute gastroenteritis is one of the most common illnesses in humans. Viruses are recognized as important cause of this disease, particularly in children under 5 years of age. Group A rotaviruses (HRV) are the major cause of pediatric acute gastroenteritis worldwide with an estimated 702,000 children die each year, the vast majority of which are in developing countries. The aim of the present study was to describe the epidemiology of rotaviral acute gastroenteritis in hospitalized children in the age group of 0-13 years.

Methods. From January to December 2006, 234 stool specimens were collected from pediatric patients hospitalized with acute gastroenteritis in the "Santa Maria Goretti" Hospital in Latina, Italy. All consecutive infants with acute diarrhea were divided into seven age groups: 0-6 months, 7-12 months, 13-24 months, 25-36 months, 37-48 months, 49-60 months, more than 60 months, and included in the study. Stool samples were analyzed for Group A human Rotavirus by using an immunochromatographic technique (VIKIA Rota-Adeno, bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France), according to the instructions of the manufacturer. Rotavirus-positive samples were examined for the presence of other enteropathogens using standard techniques.

Results. Rotaviruses were detected in 76 (32.5%) cases. The highest prevalence was seen in children from 13 to 24 months (Table). Rotavirus infection was detected with significantly higher frequency in children up to 60 months old (35.5%) when compared to children older than 60 months (20.8%) ($P < 0.05$). The prevalence was higher in males than in females. Mixed infections were observed in 5 cases (3 rotavirus-adenovirus, and 2 rotavirus-*Salmonella* spp.). Rotavirus infection was found predominantly in the winter and in the spring ($P < 0.05$), with a peak in February (18 cases).

AGE (months)	PATIENTS	HRV-POSITIVE	
		N°	%
0-6	26	6	23.1%
7-12	37	8	21.6%
13-24	55	26	47.3%
25-36	30	12	40.0%
37-48	20	7	35.0%
49-60	18	7	38.9%
>60	48	10	20.8%
TOTAL	234	76	32.5%

Conclusions. We consider that regional epidemiological informations about rotavirus infection may be important. Our study confirm that continuous surveillance of acute gastroenteritis caused by rotavirus is needed.

092

VERIFICA DI ACCURATEZZA DEL DOSAGGIO ABBOTT REALTIME HCV-RNA MEDIANTE IL 2° STANDARD INTERNAZIONALE WHO (96/798)

Chiodo F.¹, Doneda P.¹, Cò D.¹, Peverelli E.¹, Bertazzolo M.¹, Laguardia C.¹, Moretti P.¹, Pulvirenti F.R.², Fanti D.¹, Gesu G.¹¹Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Ca'Granda Niguarda, Milano²Abbott Molecular, Roma

Introduzione. Nonostante l'introduzione dell'espressione dei risultati in Unità Internazionali (UI), è riscontro pratico, peraltro segnalato anche in letteratura, che i risultati ottenuti con differenti dosaggi commerciali per la determinazione quantitativa di HCV, non siano interamente intercambiabili. Il persistere di differenze medie che in alcuni casi possono superare il valore di 0,5 log UI/mL (la soglia entro la quale si ritiene rientri la variabilità analitica e quella biologica di HCV-RNA), induce a raccomandare l'utilizzo dello stesso dosaggio in corso di terapia antivirale. Nel nostro laboratorio è in utilizzo da più di un anno, il test Abbott RealTime HCV-RNA che, offrendo contemporaneamente spiccata sensibilità (12 UI/mL) ed ampio range dinamico (linearità almeno fino 10⁸ UI/mL) ci ha permesso di utilizzare un unico metodo per il follow-up dei pazienti in terapia. Nell'ambito di uno studio collaborativo volto a valutare i preparati di riferimento che sostituiranno l'attuale 2° Standard Internazionale per l'RNA del virus dell'epatite C (96/798), abbiamo verificato le prestazioni del dosaggio Abbott RealTime HCV-RNA in termini di accuratezza, linearità in diluizione, precisione e sensibilità.

Metodi. Il preparato di riferimento internazionale 96/798, con valore nominale di 100.000 UI/mL, è stato opportunamente diluito per creare un pannello di linearità/accuratezza con valori nominali di 50.000, 20.000, 10.000, 1.000, 100, 10 UI/mL, ciascuno dei quali è stato analizzato in singolo in 7 differenti sedute analitiche.

Risultati. L'analisi di regressione lineare dei valori misurati (y) in confronto con quelli attesi (x), dava luogo ad una retta con equazione $y = 0,9123x + 0,3267$ ($R^2 = 0,9899$). Se moltiplicati per il fattore di diluizione, tutti i valori misurati fornivano un valore medio di 5,06 log UI/mL verso un atteso di 5,00 log UI/mL, un risultato in pratica completamente sovrapponibile. La precisione totale del dosaggio mostrava alle differenti concentrazioni target di 50.000, 20.000, 10.000, 1.000, 100, 10 UI/mL un coefficiente di variazione di 1,31%, 0,97%, 3,58%, 2,34%, 3,53%, 10,28% log UI/mL, rispettivamente. Di rilievo, tutte le repliche del membro del pannello con il valore atteso più basso (10 UI/mL) venivano rilevate dal dosaggio Abbott RealTime HCV, in accordo con la sensibilità dichiarata di 12 UI/mL.

Conclusioni. Il dosaggio Abbott Real-Time ha mostrato un elevato grado di accuratezza dei risultati espressi in UI/mL, un'eccellente linearità di diluizione, sensibilità almeno pari a 10 UI/mL e ottima precisione inter-saggio.

093

CONFRONTO TRA DUE DOSAGGI IN REAL-TIME PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI HBV-DNA

Ciotti M.¹, Marcuccilli F.¹, Guenci T.¹, Belladonna S.², Pulvirenti F.R.², Perno C.F.¹

¹Laboratorio di Virologia Molecolare, Policlinico Tor Vergata, Roma

²Abbott Molecular, Roma

Introduzione. Abbiamo effettuato un confronto tra due dosaggi quantitativi di HBV-DNA basati su amplificazione del target in fase omogenea e utilizzo di sonde fluorescenti: Roche COBAS Ampliprep-COBAS TaqMan HBV(CAP-CTM) e Abbott RealTime HBV. Entrambi i dosaggi prevedono l'estrazione automatica del DNA virale per affinità con microparticelle magnetiche e si basano, per la generazione del segnale, sull'idrolisi di un probe fluorescente. Le principali differenze riguardano la regione target (*pre-core* per CAP-CTM, porzione N-terminale altamente conservata del gene *S* per Abbott RealTime) e la strategia di calibrazione del test (standard interno di quantificazione per CAP-CTM; curva esterna di calibrazione memorizzata per Abbott RealTime).

Metodi. Sono stati analizzati con il test Abbott, 128 campioni di siero positivi al test CAP-CTM, compresi i campioni con target rilevato ma con risultato al di sotto del limite di sensibilità (" <12 UI/mL, target detected"). L'accuratezza del test Abbott è stata verificata mediante l'analisi del pannello proficiency QCMD HBV06-01.

Risultati. Tutti i campioni, tranne uno (<12 UI/mL con CAP-CTM), sono stati rilevati dal test Abbott, per una sensibilità relativa pari a 99,2% (127/128; IC al 95%: 97,7%-100,0%). Dei rimanenti 23 campioni con risultato CAP-CTM inferiore a 54 UI/mL (limite inferiore di quantificazione), ve ne erano 8 con risultato Abbott compreso nel range dinamico del dosaggio. Inoltre, 4 campioni fuori scala con il test Roche (>8.0 log UI/mL), erano ancora quantificabili con Abbott (limite superiore di linearità = 9 log UI/mL). Per i 100 campioni quantificabili con entrambi i metodi, l'equazione della retta di regressione lineare (y =Abbott, x =Roche) era $y=0,9916x-0,2169$, con coefficiente di correlazione $r=0,9612$. L'analisi di Bland-Altman mostrava una differenza media (Abbott-Roche) pari a $-0,246 \pm 0,26$ log UI/mL. La differenza dei valori osservati tra il test Abbott RealTime e la media generale di consenso del pannello QCMD HBV06-1 era compresa tra $-0,22$ e $+0,04$ (media= $-0,13$) se espressa in log copie/mL, come richiesto dal programma di controllo di qualità.

Conclusioni. Il nuovo dosaggio Abbott RealTime HBV ha mostrato, nei confronti del test CAP-CTM HBV, un'ottima correlazione, una sensibilità almeno equivalente ed un range dinamico più ampio. La lieve differenza di valori osservata (Abbott-Roche = $-0,246$), probabilmente dovuta a un differente processo di standardizzazione dei kit, non influenza la sensibilità del test Abbott a basso livello. In questo ambito di valori, il test Abbott appare al contrario rispondere meglio, probabilmente in virtù di un'elevata precisione.

094

RIATTIVAZIONE DI HBV DOPO TRATTAMENTO IMMUNOSOPPRESSIVO: CASE REPORT

Clerici P.¹, De Paschale M.¹, Guastoni C.M.², Neri A.L.²

¹U.O. Microbiologia,

²U.O. Nefrologia,

A.O. Ospedale Civile di Legnano (Mi).

Paziente maschio di 76 anni in dialisi peritoneale dal 1996 per postumi di glomerulonefrite post infettiva.

Da tale periodo risulta essere presente positività per anti-HBs (debole) e anti-HBc totale, mentre risulta negativo per HBsAg e anti-HCV.

Nel 2002 ricovero per peritonite sclerosante in uremico. Anti-HBs e anti-HBc totale positivi, negatività per HBsAg, e anti-HCV (HBeAg e anti-HBe negativi). Tali risultati si confermano costantemente fino al 2005.

Nel 2005 amputazione 3° dito del piede destro per lesioni ischemiche. La ricerca dell'anti-HBs risulta per la prima volta negativa (HBsAg e anti-HCV negativi), transaminasi (ALT) normali e bilirubinemia totale nella norma. Tali risultati sono rimasti invariati fino al maggio 2006.

Nel maggio 2006 ricovero per gangrena arto inferiore dx con intervento di amputazione dell'arto al 1/3 medio di coscia. Inizio terapia immunosoppressiva (Tamoxifene 10 mg 1 cp/die) per peritonite capsulante. HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HCV negativi, transaminasi (ALT) normali e bilirubinemia totale nella norma. Fino a gennaio 2007 le transaminasi sono rimaste nella norma.

Il paziente viene ricoverato nel febbraio 2007 per colecistite. ALT: 225 U/L, bilirubina totale: 6.01 mg/dL. La sierologia evidenzia una positività elevata per HBsAg (confermata con test di neutralizzazione) per anti-HBs (203 mIU/mL), HBeAg, anti-HBc IgM e anti-HBc totale (anti-HBe negativo). La ricerca dell'HBV-DNA con metodica PCR ha dato risultato positivo ($> 3.8 \times 10^6$ UI/mL).

È stato retrospettivamente ricercato l'HBV-DNA (metodica PCR) sul prelievo stoccato del maggio 2006 che è risultato positivo (1.56×10^2 UI/mL).

Le transaminasi sono lentamente discese (44 U/L) come anche la bilirubina (2.44 mg/dL) fino a metà febbraio 2007 quando il paziente è deceduto.

In conclusione il trattamento immunosoppressivo in un paziente emodializzato può riattivare un'infezione latente di HBV anche in presenza, da anni, di positività per anti-HBs.

095

SIGNIFICATO DI VCA IgG ISOLATE IN CORSO DI INFEZIONE DA EBV

Clerici P., De Paschale M., Agrappi M., Belvisi L., Cagnin D., Cerulli T., Manco M.T., Marinoni L., Mirri P., Paganini A.

U.O. Microbiologia, A.O. Ospedale Civile di Legnano (Mi)

Introduzione. Il quadro sierologico rappresentato da positività per VCA IgG e negatività per VCA IgM e EBNA crea problemi interpretativi nell'inquadramento dell'infezione da EBV. Scopo del nostro lavoro è stato di valutare l'entità del fenomeno e di interpretarne il significato.

Materiali e metodi. Sono stati esaminati per la ricerca di VCA IgG, IgM e EBNA 2422 campioni di siero (1178 maschi e 1244 femmine, età 0-92 anni) di pazienti afferenti per un controllo clinico all'U.O. Microbiologia dell'Ospedale di Legnano.

Risultati. 177 campioni (7.31%) sono risultati VCA IgG positivi e VCA IgM e EBNA negativi. Di questi, 13 (7.34%) sono risultati positivi al MonoTest.

La prevalenza nelle varie classi di età varia dal 4.5% della classe d'età 0-10 anni all'11.0% nella classe 51-60, senza differenza tra maschi e femmine.

Per 35 soggetti (di cui 7 con MonoTest positivo) è stato possibile ottenere un controllo a distanza di tempo.

Dopo tre settimane, dei 7 soggetti MonoTest positivi, il pattern anticorpale è rimasto invariato in 3 soggetti, mentre altri 3 risultavano positivi per VCA IgG e IgM (negativi per EBNA), e 1 positivo per VCA IgG e IgM e EBNA. Dei 28 soggetti MonoTest negativi il pattern anticorpale è rimasto invariato per 25 soggetti dopo tre settimane (per 10 di questi il pattern è rimasto invariato anche dopo 180 giorni e per 1 dopo 360 giorni), mentre 3 sono risultati positivi per VCA IgG e EBNA ad un controllo eseguito rispettivamente dopo 39, 100 e 202 giorni.

Conclusioni. Nella nostra casistica il profilo anticorpale in studio si presenta nel 7% circa dei casi. Nella maggioranza dei casi con MonoTest negativo questo profilo rimane costante nel tempo indicando un'infezione pregressa, mentre in oltre la metà dei casi con MonoTest positivo la comparsa nel tempo di VCA IgM depone per un'infezione acuta.

096

RILEVAZIONE DI VIRUS RESPIRATORI MEDIANTE TECNICHE TRADIZIONALI E MOLECOLARI IN PAZIENTI PEDIATRICI

Coato P¹, Boaretti M.^{1,2}, Pegoraro M², Fontana R.^{1,2}

¹Dipartimento di Patologia, Sez. di Microbiologia, Università di Verona

²Servizio di Microbiologia, Immunologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Verona

Introduzione. Le infezioni acute delle vie respiratorie inferiori nell'età pediatrica sono causa di rilevante morbidità e mortalità. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la prevalenza dei vari virus respiratori in bambini ospedalizzati per infezione acuta delle basse vie respiratorie, utilizzando sia tecniche tradizionali che tecniche di biologia molecolare.

Metodi. Gli aspirati naso-faringei provenienti da 110 pazienti pediatrici (età media: 12,8 mesi) ricoverati nel periodo dicembre 2005-maggio 2006 sono stati sottoposti ad immunofluorescenza diretta (DFA), esame colturale rapido a 24 e 72 ore ed esame colturale convenzionale per la ricerca dei seguenti virus: influenzale A e B, respiratorio sinciziale (RSV), parainfluenzale (PIV1-3) ed Adenovirus (ADV). Gli stessi campioni sono stati anche analizzati tramite PCR o RT-PCR per la ricerca degli stessi virus e inoltre per la determinazione della presenza del genoma dei Metapneumovirus (hMPV).

Risultati. Sono risultati positivi per la ricerca di virus respiratori in totale 63 campioni (57,2%) dei quali 52 per RSV, 7 per Adenovirus e 4 per hMPV. I metodi tradizionali hanno evidenziato 45 campioni positivi per la ricerca di RSV, in 7 casi l'unica indagine positiva è stata l'RT-PCR. Per quanto riguarda la ricerca di Adenovirus 3 casi sono stati rilevati mediante esame colturale e 4 positività sono emerse dall'amplificazione genica.

Conclusioni. L'RSV si conferma essere una delle cause più frequenti di infezioni respiratorie acute nei bambini ospedalizzati. Le tecniche di biologia molecolare possono essere considerate un supporto per i metodi tradizionali molto utile nella rilevazione di virus respiratori, in particolare per quanto riguarda la ricerca di Adenovirus; nel caso dei hMPV l'approccio molecolare risulta essere fondamentale non essendo ancora disponibili tecniche immunologiche specifiche.

097

ANALISI DI TRASCRITTI VIRALI DI HPV16 COME INDICATORI DI CARCINOMA CERVICALE IN SITU

Cricca M., Venturoli S., Leo E., Musiani M., Zerbini M.

Dipartimento di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale -
Divisione di Microbiologia, Università di Bologna,
Via Massarenti 9, 40138

La maggior parte delle infezioni genitali da papillomavirus umani (HPV) sono subcliniche o generano lesioni di basso grado che regrediscono spontaneamente nell'arco temporale di un anno. Se l'infezione da HPV ad alto rischio oncogeno (HR-HPV) persiste, il rischio di progressione a carcinoma cervicale invasivo diventa consistente. Scopo di questo lavoro è lo studio di markers virali di progressione neoplastica, quali i trascritti virali, per una migliore gestione del follow-up di pazienti con infezione persistente da HR-HPV.

Lo studio si è articolato in due fasi:

- 1) allestimento di tecniche quantitative di RT (reverse transcriptase)-PCR su una linea cellulare (Caski) contenente 50-60 copie integrate di HPV16 per cellula.
- 2) Analisi di campioni citologici cervicali provenienti da carcinomi in situ.

I primer sono stati disegnati per la ricerca di 3 trascritti E6/E7, che codificano per proteine oncogene, e per 3 trascritti che interessano la regione E1/E2 del genoma virale. La regione E1/E2 codifica per la proteina E2 che regola negativamente l'espressione di E6/E7. Lo studio dei trascritti E1/E2 permette di valutare l'espressione del messaggero E2 oppure la messa in opera di meccanismi di splicing per impedirne la trascrizione. Inoltre, l'analisi di E1/E2 permette di mappare le zone integre del genoma virale.

In totale sono stati analizzati 16 campioni cervicali di carcinoma in situ. Tutti i campioni sono risultati positivi ad almeno uno dei trascritti E6/E7: il 100% al messaggero E6*I, l'81% a E6*II e il 43% a E6^E7. Relativamente ai trascritti E1/E2 (nt. 865- 3853), il 63% ha mostrato un'integrità della sequenza compresa tra il nucleotide 1219 e 3375, e il 37% tra i nucleotidi 120-2726 e 120-3375, tutti i campioni sono risultati positivi ad almeno uno di questi trascritti.

Concludendo, l'espressione del trascritto E6*I da solo o con un altro trascritto E6/E7 è correlata al carcinoma in situ. Inoltre l'analisi della regione E1/E2 consente di mappare le zone integre del genoma virale e di determinare la presenza del trascritto E2 o di messaggeri alternativi.

098

ENCEFALITI DA VIRUS ERPETICI IN SOGGETTI IMMUNOCOMPETENTI: DIAGNOSI CON TEST DI PCR SU LIQUOR

Di Nicuolo G., La Porta R., Battisti S., Attanasio V.¹, Pagliano P.¹, Faella F.S.¹

Laboratorio di Virologia,
¹ I Divisione di Malattie Infettive, Azienda Ospedaliera
"Cotugno", Napoli

Introduzione. La disponibilità di trattamenti efficaci che possono modificare favorevolmente il decorso della malattia ha fatto sì che il test di PCR sul liquor, per la sua elevata sensibilità e rapidità, è divenuto d'elezione nella diagnosi di laboratorio delle encefaliti. Obiettivo del presente lavoro è analizzare i risultati ottenuti negli ultimi 6 anni presso il nostro laboratorio su 447 pazienti con encefalite. **Metodi.** La diagnosi di laboratorio per HSV1, HSV2, CMV, EBV, VZV e HHV6 è stata effettuata su campioni di liquor con metodo PCR con kit "Herpes Consensus" (Argene, Biosoft). L'analisi statistica dei risultati in associazione con le caratteristiche demografiche dei pazienti (età e sesso) è stata effettuata con Fischer's exact test.

Risultati. Lo studio include 256 maschi (57,27%) e 191 femmine (42,73%), età media 35,4 anni, femmine (37,0), maschi (34,1). La divisione dei pazienti in base all'età in 5 categorie: 0-1 anno (n=18), 2-15 (n=105), 16-30 (n=85), 30-65 (n=171), >65 anni (n=68), non ha mostrato differenze significative tra maschi e femmine. La diagnosi è stata ottenuta in 61 casi (13,65%), 26 maschi (10,15%) e 35 femmine (18,32%): 34 HSV1 (7,6%), 3 HSV2 (0,67%), 1 CMV (0,22%), 2 EBV (0,44%), 11 VZV (2,46%), 10 HHV6 (2,23%). HSV è risultato positivo in 37 casi (60,65%), con una prevalenza nelle femmine (n=24/191) rispetto ai maschi (n=13/256), $P = 0.01$. L'età media dei pazienti con encefalite da HHV6 è risultata più bassa (18,1 anni) di quelli con encefalite da HSV (42,6 anni) e VZV (46,5 anni). HHV6 è risultato prevalente nel gruppo d'età compreso tra 0-1 anni, n=4/5 (80%), rispetto agli altri gruppi di età, $P < 0.001$.

Conclusioni. Il test di PCR su liquor è molto efficace nella diagnosi di laboratorio delle encefaliti erpetiche. HSV è il principale virus erpetico associato ad encefalite in soggetti immunocompetenti. HHV6 prevale nei bambini dei primi mesi di vita.

099

L'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS UMANO NEI PAZIENTI TRAPIANTATI DI CUORE: MONITORAGGIO VIROLOGICO ED IMMUNOLOGICO

Gabrielli L.¹, Chiereghin A.¹, Lazzarotto T.¹, Potena L.², Magelli C.², Piccirilli G.¹, Monari P.¹, Pop S.¹, Grandi C.¹, Landini M.P.¹

¹U.O. di Microbiologia,

²Istituto di Cardiologia, Policlinico S. Orsola Malpighi,

Università di Bologna, Bologna

Introduzione. La quasi totalità dei pazienti trapiantati di cuore sviluppa un'infezione da CMV che nel 9-35% dei casi, in assenza di strategie di profilassi o di terapia pre-sintomatica, ha ripercussione clinica di varia entità. Questo studio ha valutato il valore diagnostico e prognostico della quantificazione di CMV in campioni di sangue di pazienti trapiantati di cuore nel monitoraggio della fase post trapianto e studiato l'andamento della risposta immunitaria cellulo T-mediata CMV-specifica durante la sorveglianza virologica.

Metodi. Sono stati monitorati 30 pazienti trapiantati di cuore di cui 3 R-/D+. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a profilassi con valganciclovir per 40 giorni post-trapianto. Il monitoraggio della fase viremica di CMV è stato condotto con il test dell'antigenemia e con la PCR-Real Time. Il monitoraggio immunologico è stato eseguito in 12 pazienti. Le sospensioni di linfociti T ottenuti dai pazienti sono stati processati con la tecnica ELISPOT. 402 sono il numero di campioni di sangue processati con i test virologici molecolari e non e 40 quelli sottoposti ad ELISPOT.

Risultati. Nonostante l'intervento di profilassi la prevalenza dell'infezione da CMV documentata dagli esami virologici è risultata pari al 70% (21/30) e dei 21 pazienti infetti, 4 hanno presentato una lieve-moderata infezione sintomatica (leucopenia e febbre). I tempi di insorgenza dell'infezione attiva da CMV sono stati in media pari a circa 75 giorni dal momento del trapianto. Dei 17 pazienti asintomatici l'intervento con terapia pre-sintomatica è stato eseguito in 6 casi (35%). I pazienti (9/12), con una precoce ricostituzione o sviluppo (entro i 30 giorni post-trapianto) della risposta immune linfocita T CMV-specifica hanno presentato una minor durata dell'infezione e picchi di carico virale ematico inferiore rispetto ai pazienti con una tardiva risposta CMV specifica.

Conclusioni. Nei trapiantati di cuore il monitoraggio immunologico, combinato con quello virologico, può ulteriormente essere di ausilio nel riconoscere i pazienti a rischio di insorgenza di infezioni recidive da CMV che, come riportato recentemente in letteratura, favoriscono gli eventi di vasculopatia coronaria del graft trapiantato e di rigetto cardiaco acuto/cronico.

100

CONFRONTO TRA DUE DOSAGGI IN REAL-TIME PER LA DETERMINAZIONE DI HBV-DNA

Galli S.¹, Meliconi M.G.¹, Vannini R.¹, Comastri G.², Pulvirenti F.R.², Furlini G.¹

¹UO di Microbiologia, Az. Ospedaliera di Bologna, Policlinico S. Orsola-Malpighi.

²Abbott Molecular, Roma

Introduzione. I dosaggi per la quantificazione di HBV-DNA si sono dimostrati utili nella valutazione pre-trattamento, nella stadiazione clinica e nel monitoraggio della terapia antivirale per l'epatite cronica B. La capacità di rilevare minime concentrazioni è utile al clinico per valutare la risposta terapeutica e attuare gli idonei interventi. Una ricaduta successiva alla cessazione della terapia antivirale, l'emergenza di mutazioni nel genoma virale associate a resistenza, o la mancanza di aderenza alla terapia, sono tutte condizioni che possono essere rilevate immediatamente se si impiegano dosaggi ad elevata sensibilità.

I progressi compiuti dalle tecnologie molecolari, ed in particolare l'introduzione della real-time PCR, sembrano finalmente realizzare la promessa iniziale di una accurata quantificazione di HBV-DNA. Abbiamo confrontato le prestazioni del nuovo dosaggio Abbott RealTime HBV (Abbott Molecular) con il test Affigene HBV Trender (SangTec).

Metodi. Sono stati analizzati con entrambi i metodi 87 campioni da pazienti con infezione da HBV. Per la valutazione della riproducibilità, un pannello di 5 membri, allestito mediante diluizioni scalari, è stato analizzato con il test Abbott in repliche di 3, in 4 differenti sedute.

Risultati. Dei 38 campioni negativi con il test Affigene, 24 erano negativi e 15 positivi con Abbott. Di questi ultimi, 8 avevano valore al di sotto del limite di rilevazione, ma con target rilevato e 7 erano quantificabili (range: 19 -722.815 UI/mL). Dei 49 campioni positivi con Affigene, 46 erano quantificabili, 2 (30 e 150 UI/mL) rilevati ma minori di 10 UI/mL, ed uno (80 UI/mL) negativo, con il test Abbott. L'analisi di regressione lineare dei 46 campioni quantificabili con entrambi i test, mostrava un coefficiente di correlazione r di 0,984; pendenza e intercetta della retta di regressione erano 0,914 e 0,343 log UI/mL, rispettivamente. Per l'82,6% dei campioni la differenza dei valori ottenuti con le due metodiche era inferiore a 0,5 log UI/mL, mentre nessuno differiva per più di 1 log UI/mL. (differenza \pm DS Abbott-Affigene = 0,01 \pm 0,36 log UI/mL). Il CV totale del dosaggio Abbott era del 18,0% 18,4% 6,8%, 11,7%, 26,4% sui 5 membri del pannello con valore medio di 5,18 , 4,16, 3,25, 1,49 log UI/mL rispettivamente.

Conclusioni. Il dosaggio Abbott Real-Time HBV ha mostrato un'eccellente correlazione quantitativa con il test Affigene Trender HBV, con valori in UI/mL intercambiabili. Fatta salva la specificità del metodo, il test Abbott è apparso più sensibile, avendo fornito risultato positivo su circa il 30% dei campioni negativi con Affigene. La riproducibilità del metodo è apparsa eccellente. Il dosaggio Abbott Real-Time è utile nel monitoraggio dei pazienti con epatite cronica B in terapia antivirale.

101

VALUTAZIONE DEL DOSAGGIO ABBOTT REAL-TIME HCV-RNA

Galli S.¹, Meliconi, M.G.¹, Vannini R.¹, Comastri G.², Pulvirenti F.R.², Furlini G.¹

¹UO di Microbiologia, Az. Ospedaliera di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi.

²Abbott Molecular, Roma

Introduzione. La tecnologia di amplificazione e di rilevazione in real-time di HCV-RNA offre indubbi vantaggi nella valutazione dell'efficacia della terapia nei pazienti con epatite C cronica. Infatti l'ampio intervallo lineare e la spiccata sensibilità di cui sono capaci i test in real-time rispetto ai test in PCR convenzionale, consentono di superare l'attuale necessità di utilizzo di test qualitativi (altamente sensibili) e quantitativi (con sensibilità insufficiente a verificare l'eradicazione dell'infezione). Abbiamo valutato le prestazioni del dosaggio Abbott RealTime HCV-RNA, con estrazione automatica (preparatore m2000sp) e amplificazione/lettura sul cycler m2000rt. Il range dichiarato di linearità (volume input 0,5 mL) è di 12-10⁸ UI/mL. La sonda di real-time (short linear probe) non si avvale di chimica ad idrolisi e, rimanendo in larga parte intatta, consente l'introduzione di un passaggio di ibridizzazione/lettura a bassa temperatura (35°C). In condizioni di minore stringenza è possibile quindi rilevare e quantificare correttamente anche target con numerosi "mismatches". La rilevazione e la omogeneità della quantificazione dei diversi genotipi di HCV è in tal modo assicurata.

Metodi. 117 campioni retrospettivi da pazienti con infezione da HCV, già analizzati con test quantitativo (b-DNA v3, 92 campioni) o con test qualitativo (TMA, 25 campioni), sono stati testati con Abbott Real-Time.

Risultati. Nel confronto con b-DNA, 80 campioni mostravano valore compreso nel range dinamico di entrambi i test. Il coefficiente di correlazione r è risultato pari a 0,967. Il 96,2% (77/80) dei campioni ha mostrato una differenza inferiore a 0,5 log, nessuno superava 1 log. La differenza media Abbott-bDNA è stata di 0,08±0,20 log UI/mL. Dei 12 campioni con risultato b-DNA inferiore 615 UI, 11 erano quantificabili con Abbott (range 70-1146 UI/ml) ed 1 risultava positivo, ma con valore inferiore a 12 UI/mL. Dei 25 campioni testati in modo qualitativo e tutti negativi con TMA, 24 erano negativi anche con Abbott ed uno risultava positivo, ma con valore inferiore a 12 UI/mL. L'analisi delle differenze dei valori condotta separatamente sui genotipi 1 (n=31), 2 (n=13), 3 (n=11) e 4 (n=4) ha mostrato un valore medio (Abbott-bDNA) di 0,04, 0,17, 0,26, 0,11 log UI/mL, rispettivamente.

Conclusioni. Il dosaggio Abbott Real-Time ha mostrato una elevata concordanza con i test bDNA v.3 e TMA. L'eccellente correlazione con il test b-DNA v.3 e la virtuale assenza di bias, rendono i risultati dei due test praticamente confrontabili. Il test ha dimostrato equivalenza nella quantificazione dei diversi genotipi.

102

UTILITÀ DEL TEST RT-PCR NELLA DIAGNOSI E MANAGEMENT DELL'INFEZIONE DA CMV NEL PAZIENTE TRAPIANTATO.

Maiorano G.¹, Bruno C.¹, Gentile A.¹, Sessa A.², Ferretti A.V.S.³, Pecoraro C.³, Ingala F.¹

¹U.O.C. - Ospedale Cardinale Ascalesi - ASL NA I

²D.H.Trapianti P.O. Vecchio Pellegrini - ASL NA I

³Struttura Complessa di Nefrologia e Dialisi - A.O.R.N.

"Santobono-Pausilipon" - Ospedale Pediatrico "Santobono" - Napoli

Introduzione. Scopo dello studio intrapreso è valutare l'utilità del test RT-PCR CMV-DNA quantitativo nell'ambito della diagnosi e management clinico-terapeutico del paziente trapiantato.

Metodi. Sono stati analizzati 1169 campioni sequenziali di plasma, pervenuti nell'arco di 2 anni (2005-2006) da 95 pazienti adulti e 65 pazienti in età pediatrica trapiantati di rene nell'ambito del follow-up clinico e terapeutico post-trapianto e in base ad eventi clinici verificatisi. La regione target di CMV è stata amplificata utilizzando un kit commerciale (Nanogen) range di sensibilità 80 - 1.000.000 copie/ml con rilevamento della fluorescenza su ABI PRISM 7300. I pazienti sono stati arruolati tenendo conto dell'epoca del trapianto, del numero di leucociti al tempo 0, e dell'insorgenza della sintomatologia in relazione alla viremia.

Risultati. Sono risultati positivi al test Real Time CMV DNA 25 pazienti adulti pari al 26% e 9 pazienti pediatrici pari al 13,8 %. Il trattamento terapeutico è stato adottato per 13 pazienti adulti e 8 pazienti pediatrici. La terapia farmacologica ha determinato la negativizzazione del CMV-DNA nel plasma di 11 pazienti adulti (pari allo 84%) e di 6 pazienti pediatrici (pari al 75 %). Sono risultati resistenti al trattamento 2 pazienti pediatrici e 2 pazienti adulti. I pazienti adulti non sottoposti al trattamento farmacologico avevano un numero di copie < 5600 copie/ml.

Conclusioni. Il test di RT-PCR CMV-DNA ha evidenziato precocemente la viremia nel sangue rispetto alla diminuzione dei leucociti, e in molti casi il brusco innalzamento della stessa in tempi brevi (<1 settimana).

L'utilità nell'ambito del monitoraggio terapeutico è indiscussa. Il valore predittivo dello sviluppo di malattia rimane da chiarire. Nell'attesa di una migliore standardizzazione del test, abbiamo considerato la carica virale di 5.600 copie/ml un possibile "cut-off point" a cui far seguire controlli più ravvicinati per una tempestiva instaurazione della terapia.

103

DETERMINAZIONE DELLE IgG AVIDITÀ DELLA ROSOLIA CON METODICA ELFA IN UN GRUPPO DI GESTANTI A RISCHIO.

Maiorano G., Bruno C., Gentile A., Ingala F.,

U.O.C. di Virologia - Ospedale Cardinale Ascalesi - ASL Na I

Introduzione. La diagnosi sierologica dell'infezione da virus della Rosolia si basa sulla determinazione delle IgG e delle IgM anti Rosolia in associazione al test d'avidità delle IgG.

Metodi. Lo scopo principale dello studio è quello di valutare, nell'ambito della diagnostica di laboratorio per la rosolia in gravidanza l'utilità del test per la determinazione dell'avidità delle IgG con metodica ELFA "home made" (Biomerieux) a confronto con la metodica ELISA in uso presso il nostro laboratorio (Radim). Sono state eseguite 40 determinazioni per la ricerca delle IgG avidità per la rosolia, su campioni di siero provenienti da gestanti risultate sieropositive al test per la ricerca delle IgM.

Risultati. Dei 40 campioni di sangue 22/40 sono risultati ad alta avidità e 13/40 a bassa avidità con entrambe le metodiche, 3/40 a media avidità con metodica ELFA risultavano ad alta avidità con metodica ELISA, 2/40 a bassa avidità con il test ELFA risultavano a media avidità in ELISA.

Il test della ricerca delle IgG avidità è stato eseguito considerando che per entrambe le metodiche un risultato di bassa avidità corrisponde ad un'infezione contratta nei precedenti 3 mesi.

Conclusioni. Dai risultati ottenuti si evince che il test per la ricerca delle IgG avidità con metodica ELFA consente una migliore definizione dell'infezione da rosolia in considerazione della maggiore sensibilità. In ogni caso i risultati devono essere confermati da attente valutazioni cliniche e ulteriori test diagnostici.

104

PRESENZA DEL PAPILOMAVIRUS (HPV) AD ALTO RISCHIO ONCOGENO IN PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA DELLA PROSTATA

¹Giannattasio A., ²Basile C., ²Romano F., ¹Falco E., ³Smeraglia R., ¹Ingala F.

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

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

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

Introduzione. Il ruolo del Papillomavirus (HPV) nell'etiopatogenesi del cancro della cervice uterina è noto. Studi recenti hanno dimostrato correlazione con altri tipi di cancro: cavo orale, polmone e colon. Tranne pochi casi di cancro del pene HPV nel maschio sembra dare origine solo ad infezioni sessualmente trasmesse. L'obiettivo del nostro studio è quello di dimostrare la presenza di HPV in soggetti con lesioni benigne e/o maligne della prostata.

Metodi. Esaminati 25 soggetti affetti da patologie della prostata; il DNA è stato estratto da biopsie prostatiche.

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 micropietra (Nanogen spa).

Risultati. Su 25 soggetti esaminati, 12 erano HPV negativi e di questi 3 avevano un referto biotipico positivo per cellule maligne; 5 soggetti con iperplasia prostatica e/o prostatite erano HPV positivi a basso rischio oncogeno (HPV tipo 6). Gli ultimi 8 soggetti, con biopsia positiva per cellule maligne, erano HPV positivi e la tipizzazione ha rivelato genotipi ad alto rischio oncogeno (HPV tipo 16, 45, 35). **Conclusioni.** La presenza di genotipi di HPV ad alto rischio oncogeno in soggetti affetti da cancro della prostata di vario grado (Gleason score) dimostra che questo virus potrebbe avere un ruolo importante anche nell'etiopatogenesi di questo cancro. Tali dati preliminari, seppure suggestivi, necessitano di una casistica più ampia. Inoltre sarà determinante dimostrare l'integrazione del genoma virale di HPV nelle cellule di carcinomi prostatici.

105

INFEZIONE DA CYTOMEGALOVIRUS (CMV): UN CONFRONTO TRA ANTIGENEMIA E UN TEST QUANTITATIVO IN REAL TIME PCR

Giraldi C., Greco F., Tenuta R., Savino O., Lo Bianco A.M., Spadafora M., Selvaggini S.*.

Microbiologia e Virologia, Ospedale Annunziata, AO Cosenza
*Alfa Wassermann Diagnostics, Milano

Introduzione. L'infezione da Cytomegalovirus (CMV) è la complicazione più frequente nei pazienti trapiantati.

In questo lavoro verrà confrontato il test dell'antigenemia tradizionalmente usato per il monitoraggio delle infezioni da CMV con un test quantitativo in real time PCR per la determinazione della viremia allo scopo di valutare la sostituzione di un test lungo, laborioso e richiedente interpretazione soggettiva con un test più rapido e standardizzato come la PCR real time.

Metodi. Viremia e antigenemia sono state effettuate su 71 campioni di sangue intero. La determinazione della carica virale di CMV è stata effettuata con il kit Affigene® CMV trender (Alfa Wassermann Diagnostics) con amplificazione su piattaforma MX3000p (Stratagene).

L'antigenemia è stata effettuata con CINApool Antigenemia rapida Anti-CMV umano ppUL83 (Argene). I risultati sono espressi come il numero di cellule marcate per 2×10^5 cellule.

Risultati. Nella maggioranza dei casi abbiamo ottenuto una buona concordanza tra i due metodi, in particolare il 76% dei campioni mostravano antigenemia e DNA virale negativi, il 14,8% era negativo al test di antigenemia ma positivo a Real Time PCR e solo tre campioni con antigenemia positiva sono risultati negativi al test di amplificazione.

La carica virale espressa in copie/ml determinata con il kit Affigene® CMV trender risulta proporzionale ai valori dell'antigenemia.

Conclusioni. La determinazione quantitativa in Real Time PCR potrebbe essere usata come alternativa all'antigenemia nel monitoraggio delle infezioni da CMV.

106

FOCOLAIO DI GASTROENTERITE DA NOROVIRUS CON CARATTERISTICHE CLINICO-EPIDEMIOLOGICHE ATIPICHE

Goglio A^{1,3}, Castellucci E⁴, Grigis A^{1,3}, Caglioni GCI,
Averara F¹, Locati F^{1,2}, Marziali B⁴, Di Bartolo I⁵, Ruggeri FM⁵

¹Dipart. Prevenzione Sorveglianza Infezioni (DiPSI)¹,

²Direzione Sanitaria, ³Microbiologia e ⁴Urologia,

⁵Ospedali Riuniti, Bergamo; Dipart. Sanità alimentare e animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Premessa. Sono sempre più numerosi i casi di gastroenteriti da Norovirus segnalati dai Paesi che aderiscono al Foodborne Viruses in Europe network (<http://www.eurosurveillance.org>), con centinaia di outbreak segnalati tra il 2004 e il 2006 in Germania, Inghilterra, Olanda, Ungheria. La stessa fonte non riporta dati per il nostro Paese. I focolai di diarrea da Norovirus sono di solito ben riconoscibili per: breve incubazione (15-48 ore), durata della malattia di 12-60 ore, vomito in più del 50% dei malati sintomatici, contemporanea infezione di malati e operatori sanitari.

Obiettivo. Descrivere una piccola epidemia, verificatasi in un reparto degli Ospedali Riuniti di Bergamo, sostenuta da Norovirus, con caratteristiche clinico-epidemiologiche inusuali.

Dati clinico-epidemiologici. Il 26/1/2007 il Gruppo Operativo del DiPSI veniva informato di un possibile focolaio di gastroenterite nella USC Urologia (tre casi di diarrea, senza febbre, né vomito). L'indagine epidemiologica rilevava altri tre casi nei giorni precedenti nella stessa USC (il 19, 23 e 24 gennaio, con la stessa sintomatologia). Venivano messe in atto le misure previste per le infezioni da Norovirus, pur in presenza di un quadro clinico ed epidemiologico che sembrava escludere tale eziologia: precauzioni da contatto, ma anche da droplet, e ricovero dei malati in stanze e bagni dedicati. E' stato così possibile contenere il focolaio (19 persone colpite tra il 26/1 e il 7/2, in un reparto con 55 posti letto che ha continuato ad operare durante questo periodo). Non è stato invece possibile identificare la fonte.

Indagini microbiologiche. Le indagini microbiologiche sono risultate negative per: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, Rotavirus, Adenovirus, *C. difficile*. Tre campioni su undici sono risultati positivi per Norovirus con un test immunoenzimatico (Ridascreen Norovirus, 2^a generazione, r-Biofarm). Le indagini molecolari, RT/PCR con primer diagnostici JV12 e JV13 su regione polimerasica hanno dato esito negativo, mentre l'Rt/PCR condotta utilizzando i primer GIISKR/GIISKF che amplificano un frammento della regione capsidica hanno dato esito positivo in 4 campioni su 11.

Conclusioni. L'episodio descritto suggerisce di considerare la possibile eziologia da Norovirus nei focolai di diarrea, anche quando le caratteristiche cliniche ed epidemiologiche non siano suggestive per una infezione da Norovirus.

107

VALUTAZIONE ESTERNA DELLA QUALITÀ DELLA RICERCA DI CMV-DNA IN SANGUE ESSICCATO

Mammoliti A., Binda S., Battezzati V., Didò P., Barbi M.

Sez. Virologia - Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia, Università degli Studi di Milano

Introduzione. La ricerca del DNA di CMV su sangue neonatale essiccato su carta da filtro (CMV-DBS test) costituisce un valido mezzo diagnostico di infezione congenita con importanti ricadute cliniche ed epidemiologiche. La maggior parte dei laboratori usa metodi sviluppati "in house" per cui non sono disponibili controlli interni standardizzati. Inoltre controlli di qualità esterni hanno dimostrato che la qualità dei diversi metodi di amplificazione del DNA varia da laboratorio a laboratorio. Per questi motivi, QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) e ECCI (European Congenital CMV Initiative) hanno organizzato uno studio di controllo di qualità del CMV-DBS test.

Metodi. Ogni pannello era composto da 9 campioni consistenti in 2 spot di sangue essiccato su carta da filtro: 6 dei campioni derivavano da sangue intero negativo per CMV addizionato del ceppo Towne di CMV a diverse concentrazioni (7.3×10^2 - 9.6×10^5 copie/ml), 1 era un campione clinico positivo per CMV e 2 campioni erano costituiti da sangue intero CMV negativo senza aggiunta di virus. Ogni laboratorio doveva fornire dettagli sulla metodica usata ed in particolare sul sistema di amplificazione (PCR convenzionale "in house" e Real-time PCR commerciale e "in house").

Risultati. Ventinove dei 33 laboratori partecipanti, hanno riportato complessivamente 33 serie di risultati ottenuti mediante PCR convenzionale (n=5) o Real-time PCR (n=28). Il 91% dei partecipanti ha identificato i campioni contenenti concentrazioni virali pari ad almeno 8.8×10^4 copie/ml, il 59% concentrazioni fino a 9.4×10^3 copie/ml, mentre solo il 12% ha individuato come positivi i campioni a minor carica virale. In 5 casi è stato riportato un falso positivo (7,6%).

Conclusioni. I risultati evidenziano la necessità di migliorare le metodiche utilizzate in termini di sensibilità. In alcuni laboratori deve essere inoltre risolto il problema delle cross-contaminazioni.

108

UTILIZZO DI SANGUE INTERO ESSICCATO SU CARTONCINO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI HIV-1 RNA

Marconi A.¹, Gennari W.², Tagliazucchi S.², Comastri G.³, Pulvirenti F.R.³, Pecorari M.², Zazzi M.¹

¹Sezione di Microbiologia, Università di Siena,

²Sezione di Microbiologia e Virologia, Policlinico di Modena,

³Abbott Molecular, Roma

Introduzione. La determinazione della carica virale di HIV-1 su sangue intero essiccato su cartoncino ("Dried Blood Spot" o DBS) presenta dei vantaggi di ordine pratico rispetto al plasma liquido (PL) ed è particolarmente indicata nei paesi in via di sviluppo. Lo scopo del nostro studio è stato quello di verificare l'utilizzo di DBS con il dosaggio Abbott RealTime HIV-1, un test che impiega un particolare formato di tecnologia real-time ("partially double stranded probe"), sviluppato appositamente per tollerare la diversità genetica di HIV-1.

Metodi. Sono stati analizzati, per ciascuno dei 169 soggetti con infezione da HIV-1 inclusi nello studio, un campione di PL e uno di DBS. I campioni di PL sono stati testati con il dosaggio Abbott RealTime HIV-1 (protocollo con volume iniziale da 1.0 mL), utilizzando il sistema strumentale Abbott m2000, che prevede estrazione degli acidi nucleici, preparazione e dispensazione della mastermix in totale automazione (m2000sp), seguiti da amplificazione e rivelazione in real-time (m2000rt). I campioni di DBS (Whatman 903) sono stati conservati, prima del dosaggio, a temperatura ambiente per un tempo mediano di 26 giorni (range: 1-170). Per ogni paziente sono stati impiegati due spot da 50 microlitri, ottenuti con un punzonatore ed eluiti con tampone di lisi (kit di estrazione m2000sp). Il surnatante è stato poi analizzato con il sistema m2000sp/m2000rt (protocollo da 1,0 mL).

Risultati. I campioni di DBS sono risultati positivi nel 90%, 94,7% e 100% dei campioni con viremia plasmatica compresa tra 2,3 e 3,0; 3,0 e 4,0; 4,0 e 6,1 log copie/mL, rispettivamente. L'analisi di regressione lineare ha mostrato un coefficiente di correlazione r di 0,871. La differenza (media \pm DS) tra DBS e PL è stata di 0.01 ± 0.39 log copie/mL. Il 78,52% (128/163) e il 99,4% (162/163) dei campioni hanno presentato differenza inferiore a 0,5 e 1,0 log, rispettivamente. La differenza DBS-PL non è correlata con il tempo di conservazione dei DBS ($R^2 = 0,0008$ e $0,0451$ per i due gruppi di campioni provenienti dai due siti), a dimostrazione della stabilità dell'RNA di HIV-1 sui cartoncini Whatman 903.

Conclusioni. I campioni di DBS possono essere usati come mezzo di raccolta e conservazione del sangue nel monitoraggio dell'infezione da HIV e della risposta alla terapia antiretrovirale. La totale automazione, la capacità di rilevare e quantificare correttamente tutti i sottotipi virali e le eccellenti prestazioni mostrate in questo studio sui DBS, rendono il dosaggio Abbott RealTime HIV adeguato per la routine nei paesi in via di sviluppo con una elevata prevalenza di infezione da HIV-1.

109

EPISODIO EPIDEMICO DI GASTROENTERITE DA NOROVIRUS DI SOSPETTA ORIGINE ALIMENTARE IN UNA CASA DI RIPOSO.

Martinelli M¹, Medici MC¹, Calderaro A¹, Arcangeletti MC¹, Morelli A², Abelli LA¹, Portincasa P¹, Larini S¹, De Conto F¹, Pinardi F¹, Esteban MDP¹, Somenzi P¹, Preti S¹, Casula F¹, Dettori G¹, Chezzi C¹.

¹Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma, Viale Antonio Gramsci 14, 43100 Parma;

²Dipartimento di Salute Pubblica, Servizio di Igiene Pubblica, Unità Sanitaria Locale, Langhirano, Parma.

Introduzione. La trasmissione dell'infezione da norovirus (NoV) avviene attraverso il circuito fecale-orale, spesso veicolata da alimenti e acqua contaminati. Un episodio epidemico di gastroenterite acuta si è verificato presso una casa di riposo per anziani nella provincia di Parma, nei giorni immediatamente successivi ad un pranzo pre-natalizio organizzato nella stessa casa il 20 dicembre 2006.

Metodi. Tutti i soggetti che avevano manifestato diarrea (≥ 3 evacuazioni entro 24 ore) e/o vomito rientravano nella definizione di pazienti con gastroenterite. Di 127 partecipanti al pranzo (79 residenti, 24 operatori e 24 invitati) 61 sono stati intervistati (54 residenti non sono stati intervistati in quanto non attendibili). Campioni di feci sono stati raccolti da 31 soggetti (12 sintomatici, 8 asintomatici e 11 residenti non attendibili). Le feci sono state sottoposte a indagini batteriologiche, parassitologiche e virologiche per la ricerca dei comuni agenti di enterite e a nRT-PCR per la ricerca di NoV.

Risultati. L'episodio ha coinvolto almeno 35 soggetti (tasso di attacco: 57,4%). Di questi, 21 erano residenti, 8 operatori e 6 invitati. Nel 94,3% dei casi la gastroenterite è comparsa entro 48 ore dal pranzo pre-natalizio. I sintomi sono stati vomito nell'80%, diarrea nel 60%, nausea nel 40%, febbre nel 22,8% e addominalgia nel 25,7%. Il cibo servito al pranzo pre-natalizio è stato sospettato quale veicolo della trasmissione dell'infezione. Tuttavia nessun alimento in particolare è stato dimostrato associato alla malattia.

NoV è stato rivelato in 24 (77,4%) soggetti: 12 sintomatici, 6 asintomatici (3 dei quali erano operatori di cucina) e 6 residenti non attendibili. L'analisi delle sequenze degli ampliconi di NoV ha rivelato trattarsi di ceppi riferibili allo stesso genotipo.

Conclusioni. La curva epidemica e l'identità di sequenza dei ceppi di NoV rivelati supportano l'ipotesi di una comune sorgente di infezione. È verosimile che il cibo sia stato contaminato dagli operatori di cucina infettati e asintomatici poco rispettosi delle norme igieniche per la manipolazione del cibo.

110

VALUTAZIONE DEI SAGGI RUBELLA IgG E IgM SUL NUOVO STRUMENTO VIDIA®.

Medici M.C., Martinelli M., Albonetti V., Chezzi C., Dettori G.

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

Introduzione. Il nuovo strumento VIDIA® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) è un sistema completamente automatizzato basato su chemiluminescenza e microparticelle magnetiche. Il sistema in combinazione con i saggi VIDIA Rub IgG e VIDIA Rub IgM (bioMérieux) permette la rivelazione rapida nel siero delle immunoglobuline (Ig) G e M specifiche anti-virus della rosolia. In questo studio è stata condotta una valutazione analitica dei saggi VIDIA Rub IgG e IgM a confronto con quella dei saggi automatizzati VIDAS® (bioMérieux), AxSYM® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill) e LIAISON® (DiaSorin, Saluggia, Italy) per la ricerca di IgG e IgM anti-virus della rosolia.

Metodi. La valutazione è stata condotta retrospettivamente su 209 sieri conservati congelati e appartenenti a 195 soggetti e prospettivamente su 211 sieri raccolti da 210 soggetti.

Risultati. Relativamente al saggio VIDIA Rub IgG, la sensibilità e la specificità sono state del 100% sia nello studio retrospettivo che in quello prospettico. Le sensibilità e specificità complessive degli altri 3 saggi per rosolia IgG variavano da 99,4% a 100% e da 83,9% a 100%, rispettivamente. Relativamente ai saggi per rosolia IgM, nello studio retrospettivo la sensibilità è stata del 100% per tutti i sistemi tranne per AxSYM (33,3%). Nello studio prospettico non è stato possibile determinare la sensibilità dei saggi per rosolia IgM dal momento che non sono stati ottenuti esiti positivi.

La specificità complessiva del saggio VIDIA Rub IgM è stata 99,8% rispetto a 100% del saggio VIDAS, 98,8% del saggio LIAISON e 98,5% del saggio AxSYM.

Conclusioni. I saggi per la ricerca di IgG e IgM anti-virus della rosolia mediante i sistemi VIDIA e VIDAS si sono dimostrati ugualmente efficaci, mentre AxSYM e LIAISON hanno rivelato una minor sensibilità e specificità.

111

PREVALENZA DEI GENOTIPI HCV E APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA

Nisi L., Tripaldi R., Simonetti I., Matarrese G., Lopresto G., Prete A., Conserva R.

Laboratorio Analisi-Patologia clinica P.O. Centrale ASL TA

Introduzione. Il genoma del virus C dell'epatite è altamente variabile e viene classificato in 6 gruppi di genotipi, contenente 1 o più sottotipi. L'accurata determinazione del genotipo è importante nella gestione del paziente candidato al trattamento IFN + Riba condizionandone sia la dose che i tempi di somministrazione.

Scopo. Valutare la frequenza dei genotipi e l'appropriatezza della richiesta nei pazienti afferenti alla nostra U.O.

Materiali e Metodi. Nel periodo gennaio-dicembre 2006 ci sono pervenute 800 richieste di determinazione dell'HCV genotipo. L'RNA virale è stato estratto da plasma la cui positività è stata rivelata attraverso una RT-PCR (Cobas Amplicor Hepatitis Virus Test v.2.0 Roche). I campioni positivi pari a 652 sono stati tipizzati con tecnica di ibridazione inversa (Versant Genotype 2.0 Lipa Bayer).

Risultati. I campioni da noi esaminati hanno presentato i seguenti genotipi: nel 35.5% 1b, nel 28.3% 2a/2c, nel 20.2% 3a, nell'8.5% 1a, nel 5.2% 4c/4d, nell'1.38% 4, nell'1.2% 1, nello 0.6% 1a/1b, nello 0.6% 1b+3a.

Conclusioni. I risultati ottenuti evidenziano una prevalenza, così come atteso, dei genotipi 1b, 2a/2c, 3a. Rispetto alle precedenti statistiche significativo è l'incremento del genotipo 3a (11.45%), mentre non si evidenzia un incremento del genotipo 4 come riportato in altri studi. Interessante il riscontro di 4 casi (0.6%) in cui si è evidenziata la presenza di 2 genotipi (1b+3a), che meriterebbe ulteriori approfondimenti clinico-diagnostici. L'alta percentuale di campioni non genotipizzabili per assenza di genoma virale (18.6%), evidenzia la necessità di un'integrazione tra clinico e laboratorista al fine di un razionale utilizzo dei test NAT, per migliorare l'appropriatezza della domanda con ottimizzazione del rapporto costi-benefici.

112

VALUTAZIONE DI UNA METODICA DI REAL TIME PCR PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI HCV RNA

Racca S.¹, Ardemagni A.¹, Santoro F.¹, Comastri G.², Pulvirenti F.R.², Clementi M.^{1,3}

¹Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale S.Raffaele, Milano

²Abbott Molecular, Roma

³Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

Introduzione. L'adozione nei kit diagnostici del formato "real-time" rappresenta un indubbio progresso nel monitoraggio della risposta alla terapia antivirale dei pazienti con infezione da HCV. L'utilizzo di probe fluorescenti in grado di emettere il segnale associato alla formazione dei prodotti di amplificazione, consente infatti di disporre di risultati quantitativi e allo stesso tempo di raggiungere sensibilità uguale o superiore ai tradizionali test qualitativi. La real time PCR inoltre può quantificare con accuratezza livelli di HCV RNA lungo un intervallo di valori che può estendersi per 6 o 7 ordini di grandezza. Un singolo test può quindi far fronte alla duplice richiesta di test qualitativi e quantitativi, offrendo maggiori velocità ed efficienza diagnostica. Fino a tempi relativamente recenti, i test in real time PCR sono stati disponibili solo sotto forma di dosaggi "in-house". Abbiamo valutato le prestazioni del test Abbott RealTime HCV (range di linearità: 12-10⁸ UI/mL), un dosaggio che prevede purificazione dell'RNA, preparazione e dispensazione della mastermix e amplificazione/rilevazione completamente automatici.

Metodi. Analisi su campioni non selezionati, afferenti al Laboratorio con richiesta di HCV-RNA qualitativo, testati con Roche Cobas Amplicor (18 campioni), o quantitativo, testati con Versant HCV-RNA 3.0 (75 campioni).

Risultati. Per 17 dei 18 campioni con richiesta qualitativa, il risultato del test Abbott RealTime e Amplicor era concordante (1 campione era negativo con Amplicor e "<12 UI/mL, target rilevato" con Abbott). Dei 75 campioni con richiesta quantitativa, 15 erano negativi e 57 positivi per entrambi i test; 3 campioni erano negativi con b-DNA e quantificabili con Abbott RealTime (14, 302, 368 UI/mL). L'analisi di regressione lineare condotta sui 57 campioni con valore compreso nel range dinamico di entrambi i test, mostrava un coefficiente di correlazione r pari a 0,814. Il 75,4% e il 93,0% dei campioni ha mostrato una differenza nei valori di UI/mL inferiore a 0,5 e 1,0 log, rispettivamente. La differenza media Abbott-bDNA è stata di 0,19 log UI/mL.

Conclusioni. Il dosaggio Abbott Real-Time HCV ha dimostrato buona concordanza con il test qualitativo e buona correlazione con il test b-DNA. Questa metodica ha mostrato caratteristiche tali da poter essere utilmente impiegata come unico saggio per la determinazione di HCV RNA nella valutazione della risposta virologica in corso di trattamento, al termine della terapia antivirale, e, infine, per le successive verifiche dell'eradicazione virale.

113

SPORADICA PRESENZA DI NOROVIRUS NEI PAZIENTI AFFETTI DA GASTROENTERITE

Rimoldi SG.¹, Pagani C.¹, Drago L.¹, Lombardi A.¹, Tocalli L., Molteni E.¹, Bossi C.¹, Tonielli C.¹, Gismondo MR.¹

¹Unità Operativa di Microbiologia,

Azienda Ospedaliera Polo Universitario L. Sacco di Milano

Introduzione. I Norovirus sono virus a RNA appartenenti alla famiglia dei Caliciviridae di cui sono noti sette genogruppi, solo GI, GII e GIV sono associabili a gastroenteriti umane.

Hanno un'incidenza di stagionalità prevalentemente nel periodo invernale e sono caratterizzati da una diffusione rapida sia per via oro-fecale che mediante aerosoli.

Numerosi episodi in tutto il mondo li vedono responsabili di casi clinici epidemici, tanto da essere considerati al terzo posto tra i più comuni agenti eziologici responsabili della gastroenterite virale.

Con il nostro studio ci siamo prefissati di valutare nell'ambito dell'Ospedale L.Sacco e della realtà del bacino di utenza ad esso affluente, l'insorgenza di casi sporadici di infezione da NoV

Metodi. In un periodo tra Ottobre e Aprile 2007 sono stati raccolti 200 campioni fecali, provenienti dalla pediatria (40), poliambulatorio (79) e dalle tre divisioni di malattie infettive (81), di pazienti che accusavano una sintomatologia gastroenterica, ma negativi per Salmonella, Shigella, Yersinia, Campylobacter e Rotavirus.

Tutti i campioni sono stati testati con il kit ELISA Ridascreen (R-Biopharm AG, Germania) e confermati nella positività con RT-PCR Calici/Astrovirus consensus (Argene-Francia).

Risultati. La percentuale di positività riscontrata era rispettivamente del 5% in pediatria e nei reparti infettivi, del 4% nei poliambulatori.

Dei 9 campioni risultati positivi all'ELISA solo 4 ha trovato una conferma col il metodo biomolecolare.

Conclusioni. Il nostro studio ha mostrato nel periodo tra gennaio e aprile la presenza sporadica di Norovirus in pazienti con gastroenterite. Sono necessari ulteriori approfondimenti circa il possibile ruolo di Norovirus nei casi sporadici, nonché la loro ricerca nella pratica routinaria.

114

INFEZIONE OCCULTA DA HBV

Bonfà A., Romeo R., Genoese S.

Centro Trasfusionale A.S. N° 9 Locri Regione Calabria

Introduzione. Abbiamo seguito nel tempo, presso la nostra A.S., un paziente di anni 70 in trattamento dialitico, dal suo ingresso ad oggi.

Metodi. Per la diagnostica delle epatiti virali, che eseguiamo presso il Centro Trasfusionale della A.S., abbiamo utilizzato i kits della ditta Roche su apparecchiatura Cobas Core II con metodica immunoenzimatica su fase solida e per la ricerca dell'HBV-DNA il kit Cobas Amplicor HBV-Monitor (Roche).

Risultati. Il nostro paziente all'ingresso del trattamento dialitico, maggio 2003, presenta, relativamente alla ricerca HBV, gli anticorpi anti-HBc e anti-HBe. Nei successivi controlli quadrimestrali permane la medesima situazione. Nel novembre 2004 si evidenzia inoltre: una leggera positività di HBs-Ag, HBV-DNA=520 copie/ml, IgM anti-HBc negativo. La situazione non muta sino al marzo 2005. Nell'agosto 2005 scompaiono HBs-Ag e HBV-DNA, permangono anti-HBc e anti-HBe sino al maggio 2006. A settembre 2006 il paziente risulta positivo all'HBs-Ag con 38000 UI/ml di HBV-DNA. Questa situazione permane a tutt'oggi.

Conclusioni. Si evidenzia che l'infezione occulta da HBV, nell'arco di quattro anni, si è riattivata due volte.

115

INFEZIONE HCV CONTRATTA DOPO INDAGINE ENDOSCOPICA

Romeo R., Genoese S.

Centro Trasfusionale A.S. N° 9 Locri - Regione Calabria

Introduzione. Presso il Centro Trasfusionale dell'A.S. n° 9 afferiscono 2000 donatori che vengono abitualmente seguiti, con esami di laboratorio, anche nei periodi interdonazione.

Metodi. Un donatore abituale effettua una donazione di sangue il 20 luglio del 2005, l'unità è idonea. Il 31 agosto 2005 si sottopone ad un'indagine gastroscopia. Il 10 ottobre del 2005 dopo avere eseguito dei casuali esami di laboratorio, giunge alla nostra osservazione con transaminasi elevate, 10 volte il valore normale. Eseguiamo i marcatori delle epatiti B e C su apparecchio Cobas Core II (Roche) con metodica immunoenzimatica in fase solida e successiva ricerca di HCV-RNA quali-quantitativa con il test Cobas-Amplicor HCV-Monitor (Roche) e genotipizzazione con il test Versant HCV-Genotype Assay Lipa (Bayer).

Risultati. Il nostro paziente risulta essere anti-HCV positivo, HCV-RNA quantitativo 4000 UI/ml. Genotipo 2a/2c. Effettuiamo una ricerca sul paziente, che ha eseguito la gastroscopia immediatamente prima del nostro donatore, ed egli risulta essere HCV-RNA positivo, genotipo 2a/2c.

Conclusioni. Rimane molto alta la possibilità di contagio dopo indagini endoscopiche. È verosimile che non siano stati rispettati i tempi di disinfezione delle sonde.

116

DETERMINAZIONE DI CMV-ANTIGENEMIA E DI CMV-DNA QUANTITATIVO: TRE ANNI DI ESPERIENZA.Rossi A.¹, Bassani A.¹, Berrone A.¹, Canali E.¹, Milano A.¹, Pinese L.¹, Baj A.¹, Toniolo A.Q.¹¹*Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Università dell'Insubria e Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese.*

Introduzione. Il controllo microbiologico delle infezioni/riattivazioni sostenute da citomegalovirus (CMV) viene seguito mediante la determinazione dell'antigenemia pp65 e/o determinazione quantitativa del genoma di CMV (DNAemia). Lo scopo del presente lavoro è stato di confrontare i risultati ottenuti mediante antigenemia e DNAemia in tre anni di attività.

Metodi. E' stata ricercata la presenza di CMV in 2.875 campioni sequenziali di sangue intero prelevati con anti-coagulante [Vacutainer K2E, BD]. Si è valutata l'antigenemia pp65 [IF, Argene] e la DNAemia mediante due metodi, con Amplicor CMV Monitor [Roche] e con CMV PCR Kit [Abbott Molecular] ed estrazione manuale [Qiagen].

Risultati. Con il metodo Roche Amplicor sono state eseguite 2404 DNAemie, 521 erano positive. In 278 pp65-antigenemia era positiva (R=0,61), mentre 235 erano negative ma inferiori a 5000 copie/mL. Con il metodo Abbott Molecular sono state eseguite 471 DNAemie, di cui 166 erano positive. In 69 anche pp65-antigenemia era positiva (R=0,84), mentre 90 erano negative ed inferiori a 5000 copie/mL. Il maggior numero di DNAemie riscontrate con il metodo Abbott Molecular (161/471) è risultato significativo (p<0,001) rispetto al metodo Roche Amplicor (521/2404), anche per livelli di DNA inferiori a 5000 copie/mL (90/471 vs 235/2404). Per livelli di DNA superiori a 5000 copie/mL non è stata rilevata una differenza significativa (90/471 vs 286/2404).

Conclusioni. Il sistema Abbott Molecular ha dimostrato una maggiore sensibilità del sistema Roche Amplicor sia per il maggior numero di DNAemie, sia per livelli di DNA inferiori a 5000 copie/mL. Inoltre il coefficiente di correlazione tra DNAemia e pp65-antigenemia è risultato maggiore per il sistema Abbott Molecular (R=0,84) rispetto al sistema Roche Amplicor (R=0,61).

117

RITROVAMENTO DI VIRUS ERPETICI SU TESSUTI CUTANEI DI POTENZIALI DONATORI MULTIORGANO.

Scarasciulli M.L.[^], Calvario A.*^{*}, Bozzi A.*^{*}, Satalino M.*^{*},
Di Leonardo A.[^], Pascone M.[^]

[^] Centro Ustioni-Banca Pelle, U.O. Chirurgia Plastica,
AO Policlinico Bari

* Lab. Virologia Diretta, U.O.C. Microbiologia e Virologia,
AO Polidlinico Bari

Nonostante il trapianto di tessuti cutanei non abbia un grande impatto sui media e sull'immaginario collettivo rispetto a quello d'organo, tuttavia rappresenta una branca della medicina trapiantologica in rapida espansione che offre notevoli possibilità terapeutiche in grado di migliorare la qualità di vita ad una variegata tipologia di pazienti tra cui quelli gravemente ustionati.

Per limitare i rischi di trasmissione di infezione da trapianto di tessuto cutaneo occorre garantirne la qualità e la sicurezza attraverso uno stretto controllo microbiologico prima dell'innesto chirurgico.

Scopo dello studio la valutazione della presenza di virus erpetici HSV1, HSV2, CMV, EBV, HHV6, VZV e HHV8 sia su lembi di cute, a fresco e criopreservati, che su diversi fluidi corporei di potenziali donatori multiorgano.

Sono stati arruolati, previo consenso informato, 22 pazienti provenienti dall'U.O. di Chirurgia Plastica del Policlinico di Bari destinati a chirurgia riduttiva.

In fase pre-chirurgica sono stati testati campioni di siero, linfociti di sangue periferico (PBLs), gargarizzato e urine per ricerca di DNA dei virus erpetici target con tecnica PCR Real Time e nested.

In fase intra-chirurgica 88 lembi a tutto spessore sono stati avviati ad indagini di biologia molecolare, immunoistochimica e vitalità. In caso di positività ad uno dei patogeni in studio, i rispettivi lembi criopreservati erano avviati ai test biomolecolari per confermarne il risultato.

Dallo studio è risultato che il 72,2% dei pazienti era HSV1 e HHV8 positivo a livello ematico e nel gargarizzato; a livello cutaneo il 37,9% dei pazienti è risultato positivo per HSV1, HHV8 e VZV; tale positività è stata confermata solo nello 0,4% dei casi nei rispettivi campioni cutanei criocongelati.

Il riscontro di DNA virale in biopsie cutanee di pazienti immunologicamente competenti e quindi donatori eleggibili solleva la problematica della sicurezza del trapianto di tessuti; l'implementazione di tecniche molecolari da affiancare ad uno scrupoloso screening sierologico e anamnestico del donatore sembra opportuno soprattutto per i virus erpetici.

118

HUMAN HERPES VIRUS 8 INFECTION IN KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS

Sidoti F., Costa C., Bergallo M., Terlizzi M.E., Astegiano S.,
Re D., Segoloni G.P.*^{*}, Cavallo R.

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

*Dipartimento di Medicina Interna, Unità Trapianto Rene,
Ospedale Molinette, Torino, Italy

Introduction. Human herpesvirus 8 (HHV8) infection is associated with Kaposi sarcoma (KS) and other neoplastic and nonneoplastic manifestations. A strong association between HHV8 and KS has been evidenced in transplant recipients, particularly kidney recipients.

Methods. We have investigated the HHV8 seroprevalence by an immunoenzymatic assay in 408 patients awaiting kidney transplantation and in the corresponding 356 donors; moreover, we have tested for the presence of HHV8 DNA by nested PCR in available serum samples of the same graft recipients at 6, 12 at >18 months posttransplantation (overall 156 specimens). Associated factors, such as age, sex, area of residence, potential for HHV-8 transmission via organ transplantation, and development of KS were also investigated.

Results. Twenty (4.9%) of 408 patients and 7 (1.9%) of 356 donors were seropositive. HHV8 seropositive patients were on average about 6 years older than seronegative individuals. No difference in prevalence by gender was found. Considering the area of residence of seropositive patients, 4/161 (2.48%) were resident in Piemonte vs 16/247 (6.47%) in other areas of Italy ($p = n.s.$). During the follow posttransplantation, HHV8 DNA was found only in four patients who were seropositive before transplantation, in three cases the corresponding donor was seronegative, in one the corresponding donor was also seropositive and the recipient developed KS. At >18 months post-transplantation, two patients were HHV8 DNA positive, both were seronegative pre-transplantation and their corresponding donors were seronegative.

Conclusions. HHV8 seroprevalence in the Piemonte region seems to be low, also in a population of kidney transplant recipients. Based on our data, it does not seem that the immunosuppressive regimen favours the reactivation of HHV8. Our results do not suggest the possibility of HHV8 transmission via organ transplantation. Incidence of KS among HHV8 seropositive patients was very low.

119

VALUTAZIONE VIREMIA HHV8 IN MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE HHV8 RELATE

Marus A., Tedeschi R., °Bidoli E., Zanussi S., Bortolin M.T., Pratesi C., Pin E., *Simonelli C., De Paoli P.

S.O.C. di Microbiologia-Immunologia e Virologia,

°Epidemiologia e

*Oncologia Medica A, Centro di Riferimento Oncologico, IRCCS,

Via Franco Gallini 2, 33081 - Aviano (PN) - Italy

Introduzione. La presenza di HHV8 DNA nelle cellule del sangue periferico di pazienti (pz) HIV+ è associato ad un aumento del rischio di sviluppare sarcoma di Kaposi (KS) e, nei pazienti che hanno già sviluppato KS, allo stadio clinico del tumore. Poco chiaro resta ancora il ruolo della viremia HHV8 e soprattutto il materiale biologico più idoneo da usare nella valutazione clinica dei pz con patologie linfoproliferative HHV8-relate, quali primary effusion linfoma (PEL), malattia di Castleman (MCD), e linfoma solido HHV8 relato (SL).

Scopo. Valutare HHV8 DNA in parallelo su campioni di plasma e PBMCs nei pz che sviluppano malattie linfoproliferative HHV8 associate al fine di definire il materiale biologico più adatto e/o informativo dal punto di vista clinico, al momento della diagnosi e durante il follow-up (FU).

Metodi. Pazienti: 9 MCD HIV+; 7 PEL HIV+; 2 SL HHV8-relati e HIV+ e 2 SL HHV8-relati e HIV-; 37 KS HIV+ e 9 KS HIV- sono stati valutati come controlli.

HHV8 DNA è stato quantificato mediante real time PCR (TaqMan, ORF26) in parallelo su plasma (n=121) e PBMCs (n=121), raccolti alla diagnosi e durante FU. I dati sono stati valutati mediante test non parametrico (correlazione di Spearman).

Risultati. Alla diagnosi, tutti i pz presentavano HHV8 DNA rilevabile sia su plasma che PBMCs, eccetto un pz SL (2850c/ml solo su plasma).

Durante il FU, 1 pz PEL aveva bassa viremia plasmatica e negativa su PBMCs; 2 pz PEL e 2 pz MCD avevano bassa viremia su PBMCs e non rilevabile su plasma.

I valori di HHV8 DNA rilevati su plasma e PBMCs erano correlabili, sia alla diagnosi che durante il FU ($R=0.88$, $p<0.001$ e $R=0.76$, $p<0.001$, rispettivamente).

Conclusioni. HHV8 DNA rappresenta un sensibile marcatore virologico anche nella diagnosi delle malattie linfoproliferative HHV8 relate. Inoltre, la valutazione della viremia HHV8 su plasma e PBMCs non mostra differenze suggerendo l'adeguatezza di entrambi i materiali.

120

LINFOMA SOLIDO HHV8 ASSOCIATO DOPO TRAPIANTO AUTOLOGO: CASE REPORT

Pin E., Tedeschi R., Zanussi S., Marus A., Bortolin M.T., Pratesi C., Caffau C., *Simonelli C., De Paoli P.

S.O.C. di Microbiologia-Immunologia e Virologia,

*Oncologia Medica A, Centro di Riferimento Oncologico, IRCCS,

Via Franco Gallini2, 33081 Aviano (PN) - Italy

Introduzione. Il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) rappresenta un approccio innovativo nella cura dei linfomi. Nei pazienti sottoposti a trapianto, l'infezione o la riattivazione di HHV8 possono essere associate allo sviluppo di sarcoma di Kaposi o, come più di recente descritto, di proliferazioni linfomatose.

Case Report. Descriviamo il caso di un paziente NHL HIV+ (maschio, 45 anni) che a 3 mesi da ASCT ha sviluppato un linfoma solido HHV8 associato (SL). Il pz ad agosto 2005 aveva terminato CT di prima linea (CHOP, 6 cicli). Refrattario alla terapia, veniva quindi inserito nel protocollo ASCT (T0) e sottoposto quindi a CT di seconda linea seguita da stimolazione con G-CSF. Le cellule staminali da sangue periferico venivano quindi raccolte (T1) e, dopo CT ad alte dosi (T2), reinfuse. Il pz era in HAART di mantenimento.

HHV8 DNA era già rilevabile al T0 (5936 c/ml), mentre all'esordio di SL saliva a 194914 c/ml. Anche per EBV c'era indicazione di riattivazione (5936 e 70132 c/ml, rispettivamente T0 e a 3 mesi da ASCT), mentre la viremia CMV era sempre non rilevabile e un forte picco della viremia HIV (da <50 a 500000 c/ml) è stato riscontrato solo a 15 g da ASCT, e subito rientrato, grazie al controllo dell'HAART. Un basso controllo immunologico era presente sia al T0 che all'insorgenza del SL (CD4%: 12 e 13; CD8%: 66 e 78, rispettivamente).

Metodi. Ai tempi T0, T1, T2, 15g, 1 e 3 mesi da ASCT sono state valutate viremie HIV RNA (b-DNA, Siemens), EBV DNA, CMV DNA e HHV8 DNA (real time PCR) e studiate le sottopopolazioni linfocitarie (citofluorimetria).

Conclusioni. L'insorgenza di malattie linfoproliferative post ASCT potrebbe essere associata anche ad un'infezione attiva da HHV8. Pertanto l'indicazione allo screening e follow-up anche per questa infezione erpetica potrebbe essere utile nella prevenzione di complicanze post trapianto.

121

CONGOLESE HIV+, NAIVE, GENOTIPO F1, GRAVIDA: CRITICITÀ IN DIAGNOSTICA BIOMOLECOLARE

Tenuta R., Greco F., Savino O., Dodaro S., Gallo M., Lo Bianco A.M., Spadafora M., Perugini D., Rocca P., Noto A., Giraldi C.

Microbiologia e Virologia, Ospedale Annunziata, AO Cosenza

Introduzione. Viene descritto un caso di infezione da HIV1, genotipo F, in una donna gravida alla 16 settimana di gestazione, *naive*, proveniente dal Congo e ricoverata presso L'UOC Malattie Infettive per accertamenti diagnostici di routine.

Metodi. Numerosi campioni di sangue della donna in oggetto, sono stati testati per la ricerca degli anticorpi anti HIV1 (HIV Ag/Ab COMBO, Abbott) e Western Blot (Innogenetics), e per la valutazione della carica virale (HIV RNA) con *RealTime*-PCR (Roche COBAS TaqMan® 48 HIV) e bDNA VERSANT® HIV 3.0 (Siemens MSD). La valutazione del genotipo è stata eseguita mediante TruGene HIV-1 (Siemens MSD). Sono state eseguite indagini citofluorimetriche (Becton Dickinson).

Risultati. I risultati sierologici hanno evidenziato una sieroattività anticorpale verso HIV1 confermata da Western Blot. Le indagini citofluorimetriche mostravano una fenotipizzazione linfocitaria anomala con carenza di CD3+/CD4+ (262µl) ed un rapporto CD3+/CD4+/CD3+/CD8+ pari a 0.6. La ricerca di HIV RNA mediante il test PCR Real-Time, eseguita su più prelievi, ha dato esito negativo (inferiore a 40 copie/ml). Gli stessi prelievi sono stati processati anche con bDNA ottenendo un valore medio di 8500 copie/ml. Un'informazione più completa della difficoltà nella rilevazione della carica virale è pervenuta dal sequenziamento di HIV in termini di farmaco-resistenza e di individuazione del genotipo. Quest'ultimo dato è stato ottenuto confrontando la sequenza del campione con una banca dati HIV. L'allineamento del gene proteasi e di parte del gene RT ha dato un'elevata omologia con il sottotipo F1. Questo sottotipo ha origini in Africa ed oggi è presente anche in Europa ed in Sud America.

Conclusioni. L'analisi dei dati ottenuti indica la difficoltà del test PCR Real-Time, di rilevare alcune varianti di HIV appartenenti a sottotipi rari; più sensibile invece, si è rilevato il bDNA. Si auspica una maggior definizione delle coppie di primers in PCR Real-Time per il rilievo di quei sottotipi HIV relegati fino a pochi anni fa nelle regioni africane, ma che ultimamente sono stati segnalati con maggiore frequenza anche in Europa. In particolare, nel caso in esame, si sottolinea l'importanza della corretta valutazione della viremia nell'outcome terapeutico, a partire dalla 24 settimana gestazionale e nel follow up neonatale per l'accertamento o meno dell'infezione.

122

INCIDENCE OF HCMV INFECTION IN THE FIRST 3 MONTHS FOLLOWING RENAL TRANSPLANT

Terlizzi M.E., Costa C., Bergallo M., Sidoti F., Astegiano S., Piasentin E., Vendrame R., Segoloni G.P*, Cavallo R.

University of Turin, Dept. of Public Health and Microbiology, Virology Unit;

** Dept. of Internal Medicine Renal Transplant Unit Molinette Hospital Turin, Italy.*

Introduction. HCMV infection and disease are relevant causes of morbidity and mortality in transplant recipients. Among the patient-related risk factors for HCMV infection, particularly important is the serological status of recipient R and donor D. The aim of the study was to evaluate the incidence of HCMV infection in the first 3 months following renal transplantation according to serological matching.

Method. 1245 clinical samples obtained from 174 renal transplant recipients were studied. HCMV infection was evaluated by pp65-antigenaemia and viraemia test.

Patients were divided in four groups according to serological matching: D+/R+, D+/R-, D-/R+, D-/R-.

Results. In the D+/R- group, 4/17 patients (23.5%) were antigenaemia-positive, while none was viraemia-positive. In the D-/R+ group, 5/16 (31.3%) were antigenaemia-positive and 1 of these patients was also viraemia-positive. In the D+/R+ group, 60/138 patients (43.5%) were antigenaemia-positive, while 14 were also positive to viraemia. In D-/R- group no patient was positive to antigenaemia or viraemia. Statistical analysis was performed by the chi-square test.

Conclusion. Although D+/R- is considered a high risk group to develop primary viral infection post-transplantation, no significant difference of incidence in the first 3 months was found with respect to D+/R+ group. In the first 3 months no other patient-related risk factor seems to be associated with the development of HCMV infection in D-/R- group.

123

UTILITA' CLINICA DEL TEST GENOTIPICO HIV: CASO CLINICO

Tripaldi R.¹, Nisi L.¹, Matarrese G.¹, Buccoliero G.²,
Cristiano L.², Resta F.², Conserva R.¹.

¹Laboratorio analisi-Patologia clinica

²S.C. Malattie Infettive, P.O. Centrale-ASL TA

Introduzione. I regimi terapeutici contenenti gli inibitori della proteasi (IP) del virus HIV si sono dimostrati sicuramente più potenti rispetto a quelli con gli inibitori della trascrittasi inversa. Un regime con IP è pertanto fortemente raccomandato nei pazienti con grave immunodeficienza e alta viremia plasmatica. Ancora oggi la principale difficoltà della terapia antiretrovirale è mantenere una continua e duratura soppressione della replica virale. Le principali cause considerate sono la selezione di ceppi farmacoresistenti e la interruzione della terapia antiretrovirale dovuta alla tossicità e tollerabilità dei farmaci e alla scarsa compliance.

Metodi e caso clinico. MR maschio di 46 anni, omosessuale, anti-HIV positivo a dicembre 2003, diagnosi di AIDS per toxoplasmosi cerebrale, conta di CD4+ 15/ml e HIV-RNA 750.000 copie/ml (metodo PCR Amplicor Roche con cut off <400 copie/ml), a gennaio 2004 iniziava una terapia antiretrovirale di combinazione con d4T+3TC+LPV/r. Pur in presenza di una efficacia clinica, incremento dei CD4+ e abbattimento significativo ma sempre misurabile della viremia, veniva modificato il regime terapeutico (per alterazioni glicolipidiche e disturbi gastrointestinali) con TDF+3TC+FPV/r ad aprile 2005. Dopo 6 mesi di terapia persistendo viremia (500), veniva eseguito test genotipico di resistenza (Trugene HIV-1 Genotyping Bayer) che rilevava la mutazione 184 che conferisce resistenza solo alla lamivudina. Si intensificava il trattamento con ENF con soppressione completa della viremia. Il farmaco veniva però sospeso dopo 2 mesi per intolleranza. A giugno 2006 in presenza di HIV-RNA 370 copie/ml (metodo TaqMan HIV Roche), CD4+ 260/ml, veniva eseguito nuovo test genotipico che non rilevava mutazioni significative per resistenza; si decise una intensificazione con ATV, ma dopo 6 mesi rimane viremia persistente e CD4+ stabili.

Conclusioni. Pur in presenza di una viremia misurabile non è stata osservata comparsa di mutazioni per la proteasi né per la trascrittasi inversa in corso terapia con TDF+3TC+FPV/r. La disponibilità del test genotipico ha consentito di evitare continui switch terapeutici con i rischi correlati e permesso una intensificazione di terapia con ENF. Tale strategia si è dimostrata più efficace vs doppio IP boosterato.

124

RUOLO DEL TEST GENOTIPICO HIV NELLO SWITCH TERAPEUTICO IN CORSO DI FALLIMENTO VIROLOGICO: CASO CLINICO

Tripaldi R.¹, Nisi L.¹, Matarrese G.¹, Buccoliero G.²,
Cristiano L.², Resta F.², Conserva R.¹

¹Laboratorio analisi-Patologia clinica

²S.C. Malattie Infettive, P.O. Centrale-ASL TA

Introduzione. La terapia antiretrovirale ha modificato grandemente la storia naturale dell'infezione da HIV riducendo significativamente la morbilità e mortalità. La cronicizzazione della malattia comporta l'assunzione dei farmaci antiretrovirale quoad vitam con tutti gli svantaggi che ne conseguono. Tollerabilità, tossicità, aderenza e comparsa di resistenze sono fattori che concorrono al fallimento terapeutico essenzialmente virologico. Attualmente le linee guida hanno abbandonato l'idea di una intensificazione della terapia antiretrovirale preferendo un cambio (switch) di tutti i farmaci guidato dai risultati del test genotipico di resistenza.

Metodi e caso clinico. G.A. femmina di 39 anni, sieropositiva per HIV dal 1999 con fattore di rischio eterosessuale, alla prima osservazione aveva una conta di CD4+ 590 cellule/ml e una carica virale di HIV di 150.000 copie/ml (metodo PCR Amplicor-Roche, cut-off HIV-RNA <400 copie), con stadio clinico A1 (CDC 1993-modificato). Nel settembre 2000 in presenza di sintomi-HIV correlati, calo di CD4+ (343) ed elevata viremia (990.000) iniziava terapia antiretrovirale con d4T+dDI+EFV, con risposta clinica e immuno-virologica sino a giugno 2002. Successivamente per ricomparsa di viremia misurabile (3000), non avendo la disponibilità dei test genotipici, non volendo utilizzare altra classe di farmaci per problemi di aderenza, venne effettuato switch terapeutico alla associazione Trizivir.

Venne documentata anche in questo caso una risposta immuno-virologica con viremia non misurabile (<200) sino a novembre 2004. A marzo 2005 pur in presenza di bassa viremia (HIV-RNA 400copie) fu eseguito test genotipico (Trugene HIV-1 Genotyping Bayer), che rilevò mutazioni della trascrittasi inversa (M41L,D67N,K70R,T215,K219E V75M, M184V Y188L, G190A) che conferivano resistenza a tutti i farmaci della classe e assenza di mutazioni della proteasi. Veniva pertanto iniziata una terapia di combinazione con 2 IP (LPV/r+ATV) con rapido abbattimento della viremia<40 copie (metodo TaqMan HIV Roche) mantenuta ad oggi.

Conclusioni. In caso di fallimento virologico il cambio di terapia deve essere necessariamente guidato dai test di resistenza per una efficacia immunovirologica a lungo termine. Ciò permette inoltre di evitare accumulo di mutazioni che conferiscono multiresistenza privandosi dell'opzione di una intera classe di farmaci come nel caso presentato. Fondamentale infine è stato abbassare il cut-off di misurabilità della viremia come anche la determinazione del sequenziamento in presenza di bassissimi livelli di viremia.

125

VALUTAZIONE RISCHIO RESIDUO DA EPATITE B, EPATITE C ED HIV MEDIANTE SCREENING DELLE DONAZIONI DI SANGUE CON TECNICHE NAT

Ursitti A., Cappiello G., Longo R., La Mancusa R., Coltella S., Marzano S., Spanò A.

U.O.C. Microbiologia, Virologia ed Immunologia Ospedale "S. Pertini" - Roma

Centro di Riferimento Regionale per la Sicurezza Trasfusionale

Introduzione. Il rischio di contrarre infezione attraverso prodotti trasfusionali è oggi notevolmente ridotto ma ancora presente. Per contrastare e ridurre al minimo la possibilità di infezione trasfusionale da HBV, HCV ed HIV si è proceduto ad una selezione sempre più accurata dei donatori, e soprattutto al perfezionamento dei metodi disponibili per lo screening sierologico e alla identificazione degli acidi nucleici specifici per i virus attraverso metodiche NAT (Nucleic-acid Amplification Technology). Queste ultime hanno permesso di ridurre in maniera decisamente significativa il periodo finestra e di conseguenza il rischio di trasmissione di infezioni virali attraverso la terapia trasfusionale. Riportiamo la nostra esperienza relativa allo screening trasfusionale della regione Lazio.

Metodi. Lo screening NAT per HCV, HIV-1 e HBV è stato eseguito utilizzando il test Cobas Ampliscreen Roche. Sui campioni risultati reattivi per HBV-DNA sono stati effettuati i markers dell'epatite B con metodica ECLIA. La carica virale è stata determinata mediante real-time PCR Roche. Il gene dell'antigene di superficie è stato amplificato con nested-PCR e successivamente sottoposto a sequenziamento diretto per lo studio delle mutazioni nel determinante "a".

Risultati. Da Ottobre 2001 a Maggio 2007 sono state testate per HCV-RNA 545.584 unità, 250.012 per HIV-1-RNA e 249.633 per HBV-DNA. Non abbiamo riscontrato nessun caso in fase finestra per i tre virus. Undici donatori sono risultati HBV-DNA reattivi e negativi o borderline per HBsAg. Lo studio molecolare ha identificato 10 donatori infettati con genotipo D sierotipo ayw e un donatore con genotipo A sierotipo adw. Tre sequenze erano *wild type*, otto risultavano mutate, una presentava la mutazione G145R (escape mutant). La viremia di tutti i donatori era inferiore alla sensibilità del metodo (6 IU/mL).

Conclusioni. In termini di riduzione del periodo finestra e del RTR, i vantaggi ottenuti con l'introduzione delle metodiche NAT sono assolutamente evidenti, oggi in Italia, il rischio di trasmettere con la trasfusione una infezione è di 1 caso su 5 milioni di unità per HCV e di 1.4 casi per milione di unità per HIV; viceversa non ci sono dati sufficienti per misurare il RTR post-NAT per infezione da HBV a causa dell'esiguo numero di donatori sottoposti a screening per HBV-DNA.

126

SIEROPREVALENZA PER HERPESVIRUS UMANO TIPO 8 IN UN GRUPPO DI PAZIENTI EMODIALIZZATI DEL NORD ITALIA.

Zoccoli A.¹; Mascheroni E.¹; Orlandi A.¹; Bonamore R.¹; Melotti S.¹; Picicco D.¹; De Vecchi A.F.²; Torresani E.¹; Lunghi G.¹.

Fondazione Ospedale Maggiore, Mangiagalli, Regina Elena; Via Francesco Sforza 35 - 20122 Milano

¹Laboratorio Chimica-Clinica e Microbiologia Sez. Virologia

²Unità Operativa Nefrologia e Dialisi

Introduzione. L'Herpesvirus umano 8 (HHV8) è un gamma-herpesvirus eziologicamente associato al Sarcoma di Kaposi (KSHV).

Le modalità di infezione da HHV8 più accreditate sono quelle per via sessuale, attraverso la saliva e gli organi trapiantati, mentre la trasmissione per via ematica è ancora oggetto di discussione.

I pazienti emodializzati hanno alto rischio di infezione mediata da sangue come dimostrato dall'alta prevalenza delle infezioni da HCV e HBV.

Scopo del nostro lavoro è stato quindi valutare la siero-prevalenza per HHV8 in un gruppo di pazienti emodializzati e in un gruppo di controllo costituito da donatori di sangue nella zona di Milano e provincia.

Metodi. È stata studiata con metodica IFA la presenza di IgG anti HHV8 nel siero di 126 pazienti emodializzati e di 101 donatori di sangue.

Risultati. La positività anticorpale si è riscontrata in 32/126 pazienti emodializzati (25 %) e in 2/101 donatori (2 %).

I risultati sono stati valutati con il test del Chi-quadrato X^2 e il tasso di positività IgG HHV8 per i pazienti emodializzati è risultato significativamente superiore a quello del gruppo controllo: $P < 0.001$.

La sieroprevalenza HHV8 osservata nei pazienti emodializzati concorda con i dati presenti in letteratura mentre la positività per il gruppo di controllo dei donatori è risultata inferiore rispetto ad altri studi dove vengono riportate percentuali comprese tra il 5% e il 25%.

Conclusioni. Il nostro studio potrebbe quindi suggerire l'ipotesi di trasmissione di infezione da HHV8 per via ematica e quindi in tal senso un aumento del rischio per i pazienti sottoposti ad emodialisi. I dati sono solo preliminari essendo lo studio ancora in corso al fine di un ampliamento della casistica.

127

PREVALENZA DEL VIRUS DELL'EPATITE B (HBV) E QUADRI SIEROLOGICI IN UN CAMPIONE DI POPOLAZIONE OSPEDALIERA

Sensini A.¹, Rampini F.¹, Zuccherini F.¹, Scarpelloni M.¹, Castronari R.¹, Galli C.²

¹Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia;

²Abbott Diagnostici, Roma, Italy

Introduzione e scopo del lavoro. Determinare la prevalenza di marcatori naturali e vaccinali di infezione da virus dell'epatite B (HBV) nella popolazione afferente al Laboratorio di Microbiologia dell'Università di Perugia, al fine di valutare gli effetti della campagna vaccinale ed eventuali differenze tra italiani e stranieri.

Metodi. Sono stati raccolti i risultati per i tre marcatori HBV di primo impatto (HBsAg, anti-HBc, anti-HBs) ottenuti nell'arco di 5 mesi. I campioni con positività per il solo anti-HBc sono stati testati anche per HBeAg, anti-HBe e IgM anti-HBc. Tutti i test sierologici sono stati effettuati con il sistema automatizzato Abbott Architect.

Risultati. Abbiamo valutato 3.515 soggetti, 3.221 (91,6%) italiani (53,4% maschi, 46,6% femmine, età media 53,2±19,8 anni) e 294 (8,4%) stranieri (41,2% maschi, 58,8% femmine, età media 36,8±15,8 anni). La prevalenza di marcatori di infezione naturale da HBV era significativamente inferiore tra gli italiani (16,5% vs. 37,4%; $p<0,001$); il 67% degli italiani con età inferiore ai 29 anni era positivo solamente per anti-HBs, rispetto al 14,3% degli stranieri nella stessa fascia di età ($p<0,001$). La positività per HBsAg era rilevabile in 77 casi (2,4%) tra gli italiani e in 17 casi (5,8%) tra gli stranieri. Il quadro di anti-HBc isolato era presente nel 4,3% degli italiani e nell'8,8% degli stranieri, e la frequenza incrementava con l'età. Il 5,2% di questi soggetti presentava una positività, a basso livelli, per IgM anti-HBc, ed il 60% tra questi ultimi aveva ALT elevate.

Conclusioni. Sedici anni dopo l'inizio (1991) della vaccinazione di massa contro l'HBV, l'Italia sta diventando un paese a bassa endemia. La maggior parte dei giovani italiani presenta un'immunità indotta dal vaccino (positività per il solo anti-HBs), mentre i soggetti ultrasessantenni HBV+ mostrano frequentemente un quadro di positività isolata per anti-HBc, generalmente correlato ad un'infezione pregressa, ma in alcuni casi con una potenziale infettività.

127a

DIAGNOSI DI INFEZIONE DA METAPNEUMO VIRUS MEDIANTE RICERCA DI ANTIGENE E PCR REAL TIME.

Lunghi G., Orlandi A., Mascheroni E., Zoccoli A., Melotti S., Picicco D., Bonamore R., Torresani E.

Laboratorio di Virologia - Fondazione IRCCS Policlinico, Mangiagalli, Regina Elena; Via Francesco Sforza 35 - 20122 Milano

Introduzione. Le infezioni acute del tratto respiratorio (ARTI), per la maggioranza ad eziologia virale, sono tra le

principali cause di morbidità e mortalità in età pediatrica. Recentemente sono stati identificati diversi nuovi virus associati ad ARTI, tra cui Metapneumo virus, (HMPV), Corona virus (HCoV) NL63, Poliovirus KI WU, Rhino virus HRV-QPM.

Tra questi, HMPV (famiglia Paramyxoviridae) individuato per la prima volta in Olanda nel 2001 è il più studiato. L'infezione da HMPV interessa oltre il 90% dei bambini in età compresa tra 5 e 10 anni con sintomatologia di varia gravità fino a bronchiolite e polmonite; colpisce inoltre soggetti anziani in comunità e immunodepressi.

Scopo del nostro lavoro è stata la valutazione di un nuovo kit per la ricerca dell'Antigene HMPV con metodica EIA in confronto con la PCR Real Time.

Metodi. Sono stati valutati 88 campioni di aspirato nasofaringeo di bambini (1-8 anni) afferiti al Pronto Soccorso Pediatrico della Fondazione Policlinico, Ma.Re Milano nel periodo febbraio-aprile 2007 e valutati per la presenza di RSV, Influenza A e B, Adenovirus.

Per la ricerca dell'Antigene in si è utilizzato il kit Human Metapneumovirus EIA (Biotrin, Dublin) mentre la PCR Real Time è stata condotta con il kit ProHMPV (Prodesse Rotterdam).

Risultati. 6/88 (6,8%) campioni sono risultati positivi per la ricerca dell'Ag HMPV con metodica EIA e con metodica PCR Real Time. Uno dei campioni risultati positivi per HMPV presentava contemporanea infezione da RSV. Peraltro 16/88 (18,2%) campioni risultavano positivi per RSV, 1/88 (1,1%) per Influenza B e 4/88 (4,5%) per Adenovirus.

Conclusioni. La percentuale di positività riscontrata, 6,8, per HMPV in periodo tardo epidemico è coerente con i dati di letteratura e ci incoraggia ad introdurre HMPV nella routine della diagnostica dei virus respiratori. Il kit per la ricerca dell'Ag HMPV EIA da noi valutato ha dimostrato ottima sensibilità e specificità e costituisce una valida alternativa alle metodiche di biologia molecolare.

127b

SIEROPREVALENZA DI ANTICORPI ANTI VZV IN UNA POPOLAZIONE DI PUERPERE.

Lunghi G., Melotti S., Orlandi A., Mascheroni E., Zoccoli A., Picicco D., Bonamore R., Beltrami B., Melchionna C., Torresani E.

Laboratorio di Virologia - Fondazione IRCCS Policlinico, Mangiagalli, Regina Elena; Via Francesco Sforza 35 - 20122 Milano

Introduzione. L'infezione da Varicella-Zoster virus (VZV), generalmente benigna, può causare complicanze sia in soggetti immunocompromessi che sani. La gravidanza, in particolare, è un periodo ad elevato rischio in quanto l'infezione contratta durante le prime 20 settimane di gestazione può causare, seppure in piccola percentuale, embriopatia, mentre nel terzo trimestre può associarsi a maggior severità della patologia materna e del neonato.

Nei paesi a clima temperato, circa il 95-98% dei soggetti in età compresa tra i 20-30 anni è sieropositivo per VZV, mentre nei paesi a clima tropicale la percentuale, nella medesima classe di età è significativamente più bassa, 75-85%.

Scopo di questo lavoro è stato lo studio della prevalenza di anticorpi anti VZV in una popolazione di 382 puerpere (età compresa tra 20 e 45 anni) afferenti al Reparto di Ostetricia

della Clinica Mangiagalli della Fondazione Policlinico, Ma.Re, al fine di valutare la suscettibilità al virus VZV in età fertile.

Metodi. La ricerca di IgG anti VZV è stata condotta con il kit Liaison VZV IgG Diasorin (Saluggia).

Risultati. Dei 382 campioni saggiati, 28 pari al 7.3% sono risultati negativi..

È interessante notare, tuttavia, che la percentuale di suscettibilità al VZV è pari al 6.8% tra le puerpere di origine italiana e pari al 9.7% tra le puerpere di origine extracomunitaria. Valutando la presenza di anticorpi anti VZV in base all'anno di nascita è possibile evidenziare un incremento della suscettibilità nelle classi di età più giovane.

Conclusioni. Questi dati preliminari sembrano supportare l'importanza di un'eventuale offerta vaccinale in età adolescenziale o alle donne suscettibili in età fertile per scongiurare il rischio delle complicanze materno-fetali dovute alla varicella in gravidanza.

128

VALUTAZIONE DI DUE TEST REAL-TIME-PCR PER CMV-DNA ASSOCIATI AD ESTRAZIONE AUTOMATICA DEL DNA DA SANGUE INTERO

Varetto S.; Pittaluga F.; Giliberto G.; Mantelli S.; Cerutti F.; Alice T.; Ghisetti V.

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

Introduzione. La terapia precoce ed il monitoraggio dell'infezione da CMV ha permesso di diminuirne la morbilità e la gravità. I recenti metodi di real-time-PCR offrono una quantizzazione in tempi rapidi con range dinamico più ampio dei tradizionali metodi end-point. Manca però una standardizzazione della matrice biologica di partenza e del metodo di estrazione del DNA.

Lo scopo del lavoro è stato di confrontare due sistemi basati sulla tecnologia real-time-PCR (Artus, Qiagen, Mi, CMV-Q, Nanogen, To) per CMV-DNA entrambi applicati a sangue intero (200 ul) mediante estrazione completamente automatizzata condotta su BioRobot MDx (Qiagen, Mi).

Metodi. Un gruppo di 37 campioni di sangue intero provenienti da un gruppo più ampio di 397 campioni da 48 pazienti con infezione asintomatica da CMV. In precedenza già analizzati per CMV DNA con real-time-PCR Q-CMV-Nanogen e pp65-antigenemia, sono stati analizzati con il metodo Artus-Qiagen. Un pannello di proficiency (0, 500, 5000, 50000, 500000 copie/ml di CMV-DNA, Acrometrix, US) è stato usato per valutare sensibilità e riproducibilità dei test.

Risultati. Con il pannello di proficiency la correlazione tra valori attesi e osservati è stata ottima per entrambi i kit ($r=0,999$) con sensibilità migliore per il Kit-Qiagen rispetto a quello Nanogen (100% e 50% alla concentrazione 500 copie/ml, rispettivamente, CV% inter-assay su tutti gli standard <60% e <40%). Per valori di antigenemia corrispondenti a 0, 1-10, 11-20, 21-50, e ≥ 51 cellule pp65 positive /200.000 leucociti, la mediana dei valori di CMV-DNA ottenuti con il kit-Qiagen è stata di 3,3; 3,5; 4,6; e 5,5 log₁₀/ml (kit-Nanogen: 3,7; 3,9; 4,6 e 5,6). La correlazione tra i 2 test è stata di 0,955.

Conclusione. La determinazione di CMV-DNA da sangue

intero mediante i due sistemi commerciali di real-time PCR è risultata riproducibile e sensibile, con un'ottima correlazione, semplificando e accelerando il processo di quantizzazione di CMV-DNA per scopi clinico-terapeutici.

129

USO DEL TEST DI GENOTIPIZZAZIONE IN PAZIENTI HBV-DNA POSITIVI IN FALLIMENTO TERAPEUTICO

Caligiuri P., Buzzzone B., Ventura A., Riccio C., Maglio A., Icardi G.

Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Genova

Introduzione. In Italia i farmaci approvati per il trattamento dell'epatite B cronica sono l'interferone alfa (IFN- α), due analoghi nucleosidici sintetici Lamivudina e Entecavir e un analogo nucleotidico sintetico, l'Adefovir Dipivoxil; altri farmaci sono ancora in fase di sperimentazione clinica. La risposta all'interferone è inferiore al 40% ed associata a diversi effetti collaterali, mentre la monoterapia con gli antivirali determina a lungo termine farmaco-resistenza. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare la prevalenza delle mutazioni associate a resistenza in pazienti HBV-DNA positivi in fallimento terapeutico.

Metodi. Nel nostro studio sono stati arruolati 54 pazienti, 49/54 trattati con Lamivudina e 5/54 in terapia combinata con Lamivudina ed Adefovir. Tutti i campioni sono stati sequenziati con il kit Trugene HBV Genotyping (Bayer-HealthCare), capace di identificare le mutazioni, localizzate nei domini B, C (YMDD) e D della regione POL/RT, che conferiscono resistenza ai tre farmaci antivirali.

Risultati. 34/54 (63%) sequenze analizzate presentavano mutazioni conferenti resistenza alla Lamivudina, di queste 15/34 (44%) la mutazione M204V/I, 15/34 (44%) la M204V e la L180M e infine 4/34 (12%) le mutazioni V173L, M204V e L180M. Solo 1 paziente tra i cinque trattati con 3TC e ADF ha sviluppato oltre alle mutazioni V173L, M204V e L180M, la mutazione L181V/T, che conferisce resistenza all'Adefovir.

Il genotipo D (47/54-87%) è risultato quello prevalente, seguito dal genotipo A (4/54-7.4%), E (1/54-1.86%), G (1/54-1.86%) ed F (1/54-1.86%).

Conclusioni. I risultati ottenuti mostrano che durante il trattamento dell'infezione cronica da HBV con i farmaci attualmente disponibili, si assiste, inevitabilmente alla comparsa di mutazioni farmaco-resistenti come avviene nell'infezione da HIV. Risulta quindi importante la disponibilità, nei pazienti in fallimento virologico, di nuove molecole in grado di inibire la replicazione virale dei ceppi resistenti ai farmaci finora disponibili. Inoltre, diventa indispensabile continuare a monitorare la comparsa di nuove mutazioni attraverso l'uso della genotipizzazione virale.

130

NUOVA REAL TIME RT-PCR PER L'IDENTIFICAZIONE E LA RILEVAZIONE QUANTITATIVA DEL VIRUS CHIKUNGUNYA IN CAMPIONI BIOLOGICI ED IN COLTURE CELLULARI

Carletti F., Bordini L., Chiappini R., Ippolito G., Sciarone M.R., Capobianchi M.R., Di Caro A., Castilletti C.

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

Introduzione. Il virus Chikungunya (CHIKV) è un *alphavirus*, trasmesso all'uomo attraverso il morso di un insetto vettore, principalmente zanzare del genere *Aedes*. Una estesa epidemia è iniziata nel 2005 in un'isola dell'Oceano Indiano, possedimento territoriale della Francia, La Reunion. Dai primi mesi del 2006 l'epidemia si è estesa anche ad altre isole ed arcipelaghi dell'Oceano Indiano, oltre che ai paesi che si affacciano sulla parte orientale come Malesia, Indonesia e soprattutto India. Molti casi sono stati importati in Europa ed anche in Italia. La diagnosi d'infezione da CHIKV è fondamentale per il controllo dell'epidemia.

Metodi. Nei laboratori di Virologia dell'INMI è stata messa a punto una nuova Real Time RT-PCR basata su sonde FRET, che ha come gene *target* il gene nsP1. *Primers* e sonde sono stati disegnati utilizzando il LightCycler probe designer V. 2.0 software.

Risultati. Questo test ha una sensibilità di 20 copie/reazione ed un *range* di linearità compreso tra 3×10^1 e 6×10^8 copie/reazione. Il dosaggio della viremia da CHIKV su sieri di pazienti con infezione acuta va da $1,3 \times 10^5$ a 6×10^8 copie/reazione. Per validare il test quantitativo, sono stati realizzati esperimenti *in vitro* di inibizione della replicazione virale, mediante l'utilizzo di IFN *alpha*. La replicazione del virus è stata valutata sia titolando la capacità infettante sia dosando la quantità di RNA del virus neo-prodotto. Come atteso, abbiamo osservato un'inibizione della produzione di particelle virali sia in termini di infettività che di produzione di RNA.

Conclusioni. Il metodo descritto è un valido strumento per la rapida rilevazione del Virus Chikungunya così come per la determinazione della carica virale nei pazienti con infezione acuta. Inoltre, l'ampio *range* di linearità ne fa un ottimo strumento per gli studi *in vitro* ogniqualvolta si presenti la necessità di quantificare la replicazione virale, come accade negli studi di efficacia dei farmaci antivirali.

131

AUMENTO DI INCIDENZA DI S. GIVE IN PIEMONTE. ANALISI MOLECOLARI E VALUTAZIONI EPIDEMIOLOGICHE

Kroumova V., Grasso S., Caroppo S., Camaggi A., Grossini E., Macaluso P., Brunelli G., Fortina G.

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

La sorveglianza delle infezioni alimentari da *Salmonella* rappresenta ancora oggi un momento importante nel controllo di queste patologie. Nell'ambito della attività di prevenzione, in Piemonte, si è realizzato a partire dall'anno 2001 un pro-

gramma di sorveglianza epidemiologica.

Durante l'anno 2005 tale attività è proseguita ed ha portato alla tipizzazione sierologica di 730 ceppi di *Salmonella*. All'interno dei vari sierotipi identificati si è evidenziata una frequenza anomala di *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Give che, dai normali 1-2 ceppi/anno, improvvisamente ha visto aumentare la sua prevalenza a 21 ceppi/anno. L'analisi molecolare di questi è stata eseguita mediante PFGE utilizzando l'enzima di restrizione *XbaI* e mediante la metodica rep-PCR (Diversilab).

I risultati ottenuti con le due tecniche hanno evidenziato la presenza di due cluster con percentuali di similarità molto elevate al loro interno e una notevole corrispondenza tra le due metodiche. Purtroppo l'impossibilità di disporre di dati epidemiologici non consente di trarre conclusioni definitive, anche se l'ipotesi di una piccola epidemia alimentare veicolata dai canali della grande distribuzione può risultare suggestiva.

132

VEQ IN BIOLOGIA MOLECOLARE (HCV, HIV, HBV): PRIME ESPERIENZE

Colao M.G.¹, Parri F.¹, Borsotti M.², Quercioli M.².

¹ Laboratorio di Sieroimmunologia, AOU-Careggi, (FI)

² Centro Regionale per il C.Q. AOU-Careggi (FI)

Introduzione. In questo lavoro vengono presentati i risultati del Programma di Verifica Esterna di Qualità per il dosaggio di HCV, HBV e HIV con tecniche di Biologia Molecolare realizzato nel 2006. Queste tecniche hanno raggiunto un ruolo consolidato nella ricerca e nella quantificazione dei genomi virali e sono utilizzate sia per la diagnosi che per la valutazione del decorso della malattia. Diventa pertanto indispensabile verificare costantemente la comparabilità dei risultati tramite una valutazione esterna della qualità.

Materiali e Metodi. Hanno partecipato 38 laboratori ai quali è stato inviato un campione positivo per ciascuno dei virus analizzati. Le risposte ricevute sono state 86 e sono state ottenute con metodiche sia qualitative (TMA, PCR) che quantitative (bDNA, PCR end-point, PCR real time) utilizzando come unità di misura il numero di copie/ml o unità internazionali (UI/ml).

Risultati. 1°Campione HCV RNA

Risposte: 32 Positivi: 30 Negativi: 2

Dei 30 positivi, 4 risposte erano qualitative e 26 quantitative, di cui 25 espresse in UI/ml e 1 in copie/ml.

I 25 valori espressi in UI/ml hanno dato media 18.465.

Esprimendo il valore in \log_{10} abbiamo ottenuto una media di 4.27 con sd 0.51 e cv pari a 11.9.

2°Campione HIV RNA

Risposte: 28 Positivi: 28 Negativi: 0

Dei 28 positivi, 4 risposte erano qualitative e 24 quantitative, di cui 3 espresse in UI/ml e 21 in copie/ml.

I 24 valori espressi o trasformati in copie/ml hanno dato media 49.450.

Esprimendo il valore in \log_{10} abbiamo ottenuto una media di 4.69 con sd 0.37 e cv pari a 7.9.

3°Campione HBV DNA

Risposte: 26 Positivi: 26 Negativi: 0

Dei 26 positivi, 7 risposte erano qualitative e 19 quantitative, di cui 18 espresse in UI/ml e 1 in copie/ml.

I 18 valori espressi in UI/ml hanno dato media 145.188.

Esprimendo il valore in \log_{10} abbiamo ottenuto una media di 5.16 con sd 0.26 e cv pari a 5.0.

L'analisi statistica è stata effettuata anche per i risultati raggruppati in base al sistema analitico utilizzato.

Conclusioni. I primi risultati hanno consentito di effettuare una valutazione positiva dello stato dell'arte. Particolarmente utile si è dimostrato l'utilizzo di standard internazionali che permettono di confrontare i risultati esprimendoli in UI/ml. L'esperienza fatta evidenzia che anche nel settore della Biologia Molecolare i programmi VEQ sono necessari al fine di una standardizzazione e al miglioramento della qualità dei risultati.

133

bla_{ACT2} : UN NUOVO DETERMINANTE DI RESISTENZA DI CLASSE C NELLA SPECIE ENTEROBACTER

D'Andrea M.M.¹, Giani T.¹, Migliavacca R.², Pagani L.², Rossolini G.M.¹.

¹Laboratorio FI.BI.M., Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Siena

²Dipartimento di Scienze Morfologiche Eidologiche e Cliniche, sezione di Microbiologia, Università di Pavia, Pavia

Introduzione. I determinanti di resistenza antibiotica di classe C attivi sui beta-lattamici costituiscono un problema di grande rilevanza per il trattamento delle infezioni nosocomiali. La loro sovrapproduzione infatti è spesso associata a multiresistenza, e la problematica è ulteriormente complicata se alla sovrapproduzione enzimatica è associata anche una ridotta permeabilità di membrana al farmaco.

Metodi. In questo lavoro è stato analizzato un isolato clinico multiresistente appartenente alla specie *Enterobacter*, che mostrava un fenotipo di sovrapproduzione di ampC rilevato con metodiche standard. La identificazione a livello di specie è stata effettuata tramite test biochimici, sequenziamento del DNA ribosomiale 16S e del gene *hsp60*. Il determinante di resistenza è stato amplificato tramite PCR, ed il frammento così ottenuto è stato sottoposto a sequenziamento su doppio filamento.

Risultati. I risultati di identificazione di specie, effettuata sia con tecniche biochimiche che molecolari, hanno fornito risultati non univoci, ma che comunque hanno portato alla identificazione dell'isolato come appartenente al genere *Enterobacter*. Il sequenziamento dell'amplificato ottenuto con i primers specifici per i determinanti di resistenza di classe C del gruppo ACT/MIR, ha portato all'individuazione di una nuova variante allelica di *bla_{ACT-1}*, chiamata *bla_{ACT-2}*. *bla_{ACT-2}* differisce da *bla_{ACT-1}* per 4 nucleotidi mentre, a livello aminoacidico, essa differisce da ACT-1 per 1 aminoacido. *bla_{ACT-2}* è stata depositata nel database EMBL con l'accession number AM076977.

Conclusioni. Il gene *bla_{ACT-2}* è stato amplificato da un ceppo clinico appartenente al genere *Enterobacter*. Le analisi biochimiche e molecolari portano alla conclusione che l'isolato è strettamente legato alle specie *sakazakii*, *cloacae* ed *amnigenus* anche se, come per altri casi riportati in letteratura, l'identificazione univoca a livello di specie più risolutiva non è possibile. Determinanti del gruppo ACT/MIR sono stati descritti in ceppi clinici solo sporadicamente e comunque, come si evince dalla letteratura, questa è la prima descrizione in Italia.

134

CORRELAZIONE TRA VARIANTI ALLELICHE DEI GENI bla_{OXA-51}-SIMILI E CLONALITÀ IN ACINETOBACTER BAUMANNII

D'Andrea M.M.¹, Giani T.¹, Fina G.¹, Mereuta A.I.², Migliavacca R.³, Pagani L.³, Rossolini G.M.¹

¹Laboratorio FI.BI.M., Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Siena

²Universitatea de Medicină și Farmacie Gr.T. Popa Iasi, Facultatea de Medicină, Disciplina de Microbiologie Medicală

³Dipartimento di Scienze Morfologiche Eidologiche e Cliniche, sezione di Microbiologia, Università di Pavia, Pavia

Introduzione. Stipiti di *Acinetobacter baumannii* multiresistenti costituiscono un grave problema nelle infezioni nosocomiali. In tutto il mondo sono state descritte epidemie ospedaliere dovute a tale microrganismo che è divenuto endemico in alcune aree geografiche. La comparazione di isolati collezionati da differenti autori non è di semplice esecuzione principalmente poiché richiede lo scambio di isolati tra differenti laboratori e la standardizzazione della tecnica di genotipizzazione impiegata.

Recentemente i determinanti di tipo *bla_{OXA-51}* simili sono stati proposti come un buon marcatore per l'identificazione di specie, in alternativa a precedenti metodologie molecolari. L'obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare la correlazione tra i determinanti residenti di tipo *bla_{OXA-51}* simili e i genotipi in una collezione di isolati clinici di *A. baumannii*.

Metodi. In questo lavoro sono stati analizzati 155 isolati clinici ottenuti da 15 differenti ospedali. L'identificazione ed i test sulla suscettibilità antibiotica sono stati eseguiti seguendo le procedure standard. La genotipizzazione è stata effettuata attraverso le tecniche di RAPD e PFGE. La rilevazione dei determinanti OXA-51 simili è stata effettuata tramite PCR seguita da sequenziamento su doppio filamento.

Risultati. Entrambe le tecniche di genotipizzazione utilizzate hanno portato all'identificazione di 5 gruppi principali di *A. baumannii*. Ciascun gruppo è caratterizzato da uno specifico gene residente di tipo *bla_{OXA-51}* simile. Sono state descritte 3 nuove varianti alleliche.

Conclusioni. È stata trovata una stretta corrispondenza tra la variante *bla_{OXA-51}* simile ed il genotipo di appartenenza di ogni isolato. I risultati ottenuti suggeriscono quindi che la tipizzazione dei determinanti di resistenza *bla_{OXA-51}* simili può essere un valido strumento per la rapida genotipizzazione di isolati clinici di *A. baumannii*.

135

PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRODUTTORE DELLA METALLO- β -LATTAMASI IMP-13 IN UN PAZIENTE AFFETTO DA FIBROSI CISTICA

Fiscarelli E.¹, Lucidi V.¹, Concato C.¹, Pollini S.², Mugnaioli C.² e Rossolini G.M.²

¹Fibrosi Cistica, Ospedale Bambin Gesù, Roma, Italia.

²Sezione di Microbiologia, Dip. di Biologia Molecolare, Università di Siena, Italia.

Introduzione. *Pseudomonas aeruginosa* è il più importante

patogeno opportunisto nei pazienti con Fibrosi Cistica (FC). La presenza di metallo- β -lattamasi (MBL) acquisite, che conferiscono resistenza ad ampio spettro verso i β -lattamici, in *P.aeruginosa* rappresenta un fenomeno allarmante in campo clinico. Determinanti di resistenza acquisiti in pazienti affetti da FC non sono di comune ritrovamento e geni di tipo *bla_{IMP}* non sono mai stati descritti. In questo lavoro riportiamo la prima identificazione di una MBL di tipo IMP in isolati di *P.aeruginosa* da un paziente con FC.

Metodi. Sono stati analizzati gli isolati di *P.aeruginosa* con profilo suggestivo di produzione di MBL provenienti da otto pazienti con FC in cura presso l'ospedale Bambin Gesù di Roma. La ricerca dei geni *bla_{IMP}* è stata eseguita mediante ibridazione, PCR e sequenziamento del DNA. Isolati retrospettivi sono stati inclusi nello studio. La clonalità dei ceppi produttori di MBL è stata analizzata mediante genotipizzazione (RAPD/PFGE).

Risultati. Da uno degli otto pazienti (una bambina di 8 anni) è stato isolato un ceppo di *P.aeruginosa* produttore di un determinante di resistenza di tipo IMP, codificato dalla variante genica *bla_{IMP-13}*. L'analisi degli isolati retrospettivi del paziente, e della loro clonalità, ha mostrato la persistenza per un periodo di 3 anni dell'isolato produttore di IMP-13. L'analisi ha inoltre evidenziato la presenza di tale determinante di resistenza fin dalla prima colonizzazione del paziente da parte di *P.aeruginosa*. Il decorso clinico della paziente è risultato caratterizzato da frequenti episodi di esacerbazione polmonare, con un lento ma progressivo declino della funzionalità respiratoria (FEV1:88%), nonostante ripetuti cicli di terapia con aminoglicosidi e chinolonici.

Conclusioni. La metallo- β -lattamasi *bla_{IMP-13}*, diffusa a livello italiano, è stata isolata per la prima volta in ceppi di *P.aeruginosa* da un paziente affetto da FC. Si rivela un fenomeno allarmante, che può avere importanti implicazioni in ambito terapeutico e di sorveglianza.

136

ENTEROCOCCI VRE: SCREENING RAPIDO

Favaro M.^{1,2}, Fontana C.^{1,2}, Pistoia E.S.¹, Mauti A.², Dianetti J.², C. Favalli.^{1,2}

¹Dipart. Medicina Sper. e Sc. Biochimiche, - Università Tor Vergata - Via Montpellier 1, 00133 Roma

²Lab Microbiologia, - Pol.Tor Vergata - V.le Oxford 81- 00133 Roma

Introduzione. Il primo enterococco vancomicina resistente (VRE) fu segnalato in Europa nel 1987. Da allora la loro prevalenza è andata aumentando, soprattutto negli USA ove si segnala una prevalenza compresa fra i 25-40%. In Europa abbiamo assistito ad un graduale incremento della prevalenza dei VRE, condizionato soprattutto dall'uso in zootecnia di molecole simil vancomicina (es avoparcina), più che ad un abuso o un misuso nell'utilizzo dei glicopetidi. Sono frequentemente responsabili d'infezioni legate alla pratica assistenziale; batteriemie 12% (7-50% fatali), infezioni urinarie 14%, endocarditi, endo-oftalmi, infezioni ferite chirurgiche 15%. Lo stesso CDC ha da tempo pubblicato linee guida e raccomandazioni per prevenire la diffusione degli enterococchi VRE. Scopo del nostro lavoro è stato quello di mettere a punto una metodica molecolare di screening rapido dei VRE a conferma o completamento della tipizzazione fenotipica. La procedura si avvale di una tecnologia di PCR in real time, applicata direttamente sugli isolati, che nel tempo

massimo di 3 h consente la definizione dei genotipi più comuni Van A, Van B e Van C.

Metodi. Il DNA proveniente da colonie isolate di sospetti VRE era estratto con il sistema Minimag (biomereieux). 5 microlitri dell'estratto venivano amplificati con una mix di primer specifici in presenza di sybr green (Platinum sybr green qPCR super-mix UDG). La reazione è stata effettuata sia in amplificazioni semplici che in multiplex. Le curve di melting permettevano di attribuire in maniera univoca la presenza di un amplificato ai rispettivi genotipi van A, van B o van C.

Risultati. Sono stati testati circa 200 campioni. Nelle reazioni sia singole che in multiplex non ci sono state interferenze né per quanto riguarda la specificità dei primer né per la stabilità. I profili ottenuti confermavano il fenotipo VRE in tutti i casi, talora evidenziando a fronte di un sospetto fenotipo Van B il genotipo van A.

Conclusioni. Il sistema il test è stato messo in routine nel nostro laboratorio e consente in un tempo di circa 3 ore di attribuire e confermare facilmente il fenotipo dei ceppi in esame.

137

REAL TIME PCR PER LA DIAGNOSI DI HERPESVIRUS NELLE INFEZIONI DEL SISTEMA NERVOSO

Gaeta A., Verzaro S., Nazzari C., Latte M.C., Fabri G., Mancini C.

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università degli Studi "La Sapienza", Ple A. Moro 5, 00185 Roma

Introduzione. I virus erpetici risultano strettamente correlati all'insorgenza di numerose infezioni del sistema nervoso centrale, che si manifestano con segni clinici per lo più non specifici. L'utilizzo di un accurato sistema diagnostico è quindi indispensabile per un corretto monitoraggio ed approccio terapeutico di queste patologie. La RT-PCR, per la sua elevata sensibilità e specificità, risulta essere il metodo più idoneo per l'analisi del liquor. Nel nostro studio abbiamo voluto analizzare i dati ottenuti dall'associazione di un sistema automatico di estrazione del DNA alla RT-PCR per standardizzare una metodica utile per la rilevazione del genoma virale.

Metodi. Sono stati analizzati 155 campioni di CSF (raccolti da Settembre 2005 a Dicembre 2006) da pazienti adulti affetti da varie patologie del SNC, afferenti ai reparti di terapia intensiva, pronto soccorso, neurologia e malattie infettive del Policlinico Umberto I di Roma. Il DNA, ottenuto attraverso un sistema di estrazione automatico, è stato analizzato quantitativamente mediante Real Time PCR tipo Taq - Man per l'identificazione di HSV-1, HSV-2, EBV, HCMV, HHV6 e VZV.

Risultati. 52 CSF (33.5%) sono risultati **positivi** ai virus erpetici testati e di questi 4 hanno mostrato **coinfezione** (2 HSV-1/VZV, 1 HSV-1/HSV-2, e 1 EBV/HSV-2). 43 CSF positivi provenivano da pazienti affetti da **meningo/encefalite acuta** (13 VZV, 12 HSV-1, 6 EBV, 4 HSV-2, 4 HHV6), 6 da soggetti con **varie sindromi neurologiche** (1 HHV6/Guillain-Barré, 2 HCMV/Guillain-Barré, 1 HHV6/Sclerosi laterale amiotrofica, 1 VZV/mielite, 1 HCMV/mielite) e 3 da pazienti **HIV positivi** (2 EBV, 1 HHV6).

Tempo di refertazione 3 ore dall'arrivo del campione clinico.

Conclusioni. L'utilizzo di un sistema di amplificazione di tipo Real Time associato ad una fase di estrazione automatica ci ha permesso di ottenere una buona efficienza diagnostica, accuratezza nei risultati ed elevata rapidità di esecuzione.

138

RAPIDA ED ACCURATA DEFINIZIONE EZIOLOGICA MEDIANTE REAL TIME PCR IN UN GRAVE CASO DI POLMONITE.

Grimaldi M., Falca M., Durante Mangoni E., Di Cecio M., Utili R., Smeraglia R.

U.O.C. Microbiologia e Virologia
Direttore: Prof. R. Smeraglia
A.O.R.N. V. Monaldi- Napoli

Introduzione. Una diagnosi microbiologica rapida consente di instaurare immediatamente un trattamento specifico e migliorare la prognosi nelle polmoniti. Il nostro laboratorio ha implementato una metodologia diagnostica basata sulla PCR *real-time* che consente di rilevare la presenza di 8 diversi patogeni respiratori in 6 ore.

Caso clinico e metodi. Un giovane di 27 anni con tosse secca, ipossiemia e stato settico non responsivo alla terapia di prima linea, per la presenza di polmonite basale destra all'rx, viene ricoverato e sottoposto a tampone faringeo profondo. Il campione è stato testato per i principali patogeni respiratori utilizzando il Light Cycler RT-PCR (Roche), che combina un termociclatore e un sistema di rilevazione, con sedute di PCR *real-time on line* in un sistema chiuso senza passaggi post-PCR, variabilità e rischi di contaminazione. Durante la fase esponenziale della PCR, ad ogni ciclo, due sonde specifiche marcate con fluorofori (FRET) si appaiano alla sequenza target insieme ai primers: ciò risulta nell'emissione di fluorescenza in quantità proporzionale all'amplificato. Inoltre, la fluorescenza aumenta con l'aumento della quantità di DNA/RNA target presente nel campione.

Ogni test ha incluso controlli positivi e negativi. Gli acidi nucleici sono stati estratti utilizzando l'High Pure Viral Nucleic Acid (Roche). L'RNA è stato retrotrascritto (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche) per la determinazione dei virus Respiratorio Sinciziale, Parainfluenzale I,II,III, e Influenza A. In parallelo, è stata eseguita l'amplificazione del DNA con hot start Taq DNA polymerase del LightCyclerFastStart RNA Master Hybridization Probes (Roche) per Legionella e Mycoplasma Pneumoniae. Infine, è stata eseguita l'amplificazione del cDNA dei suddetti virus. La PCR è risultata positiva per Mycoplasma pneumoniae.

Conclusioni. L'utilizzo della PCR *real-time* ci ha consentito di pervenire ad una diagnosi etiologica in appena 4 ore. Il trattamento specifico con azitromicina, prontamente iniziato, ha determinato la rapida e completa guarigione del paziente.

139

VALUTAZIONE DI DUE METODI PER LA RICERCA DEL DNA DI Chlamydia t.

Leone R.A., Minchella P., Nisticò S., Potente G.I., Borelli A., Caruso V., Piccoli S., Carlei M.I., Caruso D., Camerino M., Piccoli M., Cerminara M.T., Mustaro C., Gagliardi B., Nicolazzo A., Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, Presidio Ospedaliero, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Introduzione. Le infezioni urogenitali da Chlamydia trachomatis (Ct), infezioni batteriche sessualmente trasmesse, frequenti nei paesi industrializzati e prevalenti tra giovani adulti, costituiscono un problema di salute pubblica in quanto, per la maggior parte asintomatiche, possono dare complicazioni le cui sequele spesso compromettono la fertilità, soprattutto nelle donne. Il complesso ciclo biologico della Ct in cui si alternano due entità morfologiche e funzionali, corpo elementare extracellulare (infettante) e corpo reticolare intracellulare (forma replicativa), può spiegare il decorso con sintomatologia attenuata o assente. Una diagnosi precoce ed un opportuno trattamento antibiotico sono d'importanza critica per prevenire sia complicanze che trasmissione dell'infezione. Per la diagnosi diretta di laboratorio possono essere utilizzate tecniche diverse (IF, EIA, NAAT, colture cellulari) che differiscono in sensibilità e specificità. Per molti anni il metodo culturale è stato considerato il test di scelta; attualmente sono considerati "gold standard" i tests di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT), come Polymerase Chain Reaction (PCR), Strand Displacement Amplification (SDA), Ligase Chain Reaction (LCR) o Transcription-Mediated Amplification (TMA).

Scopo. Valutare due tests (PCR-Real Time e SDA) basati sulla ricerca del DNA di un plasmide criptico della Chlamydia t., presente in numero di copie da 7 a 10 per corpo elementare.

Materiali e metodi. Sono stati testati in doppio n. 245 campioni (n. 205 Tamponi endocervicali e n. 40 T. uretrali maschili), di pazienti sintomatici e non, alcuni dei quali con problemi di fertilità, afferenti nel periodo marzo-settembre 2006. Sono stati utilizzati il kit Chlamydia tr. Q-PCR Alert (metodo quantitativo PCR Real-time, ditta Nanogen) ed il kit BD ProbeTec ET Chlamydia t. (metodo qualitativo SDA, ditta BD).

Risultati. Dei 245 campioni sono risultati negativi con entrambi i metodi n. 236 (96,3 %); dei 9 risultati positivi con PCR, n. 4 sono risultati anche positivi con SDA mentre n. 5 sono risultati discordanti.

		SDA		
		-	+	
PCR-RT	Camp.	-	+	
	-	236	0	236
	+	5	4	9
		241	4	245

Discussione e Conclusioni. I risultati dimostrano una elevata concordanza (97,96 %); la discordanza (2,04 %) riguarda n. 5 campioni risultati negativi con metodo SDA e positivi con metodo PCR-RT, dei quali solo uno con un titolo DNA-Chlamydia t. significativo.

140

VALUTAZIONE DI UN NUOVO KIT MOLECOLARE PER LA DIAGNOSI RAPIDA DELLE BATTERIEMIE

Matti C., Daturi R., Sacco L., Giacobone E.

Fondaz. I.R.C.C.S. Policlinico 'San Matteo', V. le Golgi, 2,
27100 Pavia

Introduzione. La batteriemia rimane una causa importante di morbidità e mortalità, specialmente in pazienti immunocompromessi. Attualmente, presunte batteriemie sono trattate in modo empirico con antibiotici a largo spettro, in quanto una diagnosi definitiva è resa possibile solo dalle emocolture, che richiedono tempi prolungati nell'identificazione. In questo studio preliminare si vogliono confrontare i risultati ottenuti mediante un nuovo saggio molecolare (GenoType BC Gram positive®-Hain Lifescience) per la rapida identificazione dei più importanti batteri coinvolti nelle batteriemie con lo strumento automatico Phoenix (BD) per identificazione ed antibiogramma.

Metodi. 42 emocolture positive al BACTEC (BD) sono state caratterizzate con la colorazione di Gram ed in seguito identificate fenotipicamente con il sistema Phoenix (BD).

Per l'identificazione molecolare, 20ul di emocoltura positiva sono spottati su una matrice per l'estrazione del DNA (GenoCard®, Hain Lifescience), dalla quale con una penna perforatrice si preleva un tassello di 1mm di diametro e di seguito si aggiunge alla mix di amplificazione. L'amplificazione e l'ibridazione inversa su strip è condotta seguendo il protocollo del kit GenoType BC Grampositive®.

Risultati. GenoType BC Grampositive® ha identificato circa il 96% delle specie batteriche e il 100% dei geni di resistenza: solo in due casi non è stata possibile l'identificazione, in quanto assenti le sonde specifiche sulla strip.

Conclusioni. Il saggio molecolare GenoType BC Grampositive® ha dimostrato di riconoscere con estrema precisione i più importanti batteri causa di sepsi e i geni associati alla resistenza agli antibiotici. Si è inoltre rivelato di semplice utilizzo con risultati disponibili in poco più di quattro ore. Il kit GenoType BC si è rivelato molto utile nella diagnosi rapida delle sepsi con indiscusso vantaggio per i pazienti immunocompromessi.

141

DIAGNOSI MOLECOLARE DI *M. Tuberculosis*.: "Amplified MTD", MULTIPLEX-PCR* E REAL- TIME* PCR (*home-made) A CONFRONTO

Morelli S., Pace A., Fantini S., Torsani M., Sambri V.,
Nanetti A., Dal Monte P.DMCSS, sez. Microbiologia, Università di Bologna,
via Massarenti 9, 40138 Bologna

Introduzione. I lunghi tempi necessari alla crescita in coltura di *M. Tuberculosis*, spingono sempre più ad affinare tecniche molecolari in grado di dare un risultato specifico in tempi rapidi.

Metodi. Da diversi anni impieghiamo il sistema "Amplified MTD" che impiega il metodo TMA (Transcription-Mediated-Amplification) per identificare in maniera qualitativa l'rRNA di *M. tuberculosis complex* nei materiali respiratori. Questo metodo presenta almeno due grossi limiti: è piuttosto indaginoso e ci sembra difficoltosa la gestione dei dati negativi: il campione è un vero negativo, oppure l'infezione è dovuta ad un micobatterio non tubercolare (MNT). Abbiamo quindi messo a punto una *multiplex-PCR* che utilizza due coppie di primers: ITS-F e Mycom-2 che amplificano un frammento di 300 bps specifico per *Mycobacterium spp.*, e TBF e TBR che amplificano una regione specifica di *M. tuberculosis* di 121 bps (Heekyung et al. J. Clin. Microb., 2000; 38:4080-4085). Con le due tecniche sono stati saggiati 75 campioni provenienti dalle vie respiratorie. Per gli stessi sono stati rispettivamente allestite le colture standard. Inoltre per 10 ceppi noti, (1 *Stafilococcus spp.*, 1 *Streptococcus fecalis*, 1 *Escherichia coli*, 1 *C. albicans*, 4 *M. tuberculosis*, 1 *M. avium*, 1 *M. gordonae*) è stata tentata una *Real-time PCR* utilizzando sugli stessi primers la tecnologia *CYBR-green*.

Risultati. La concordanza fra coltura e *multiplex* è risultata del 93,3%; fra coltura e "Amplified MTD" del 89,3%. Di 16 campioni positivi, la PCR *home-made* ne ha identificati 11, "Amplified MTD" solo 8. Per quanto riguarda la *Real-time PCR* questi sono i dati preliminari: solo i ceppi di micobatteri si sono amplificati con i primers per la regione ITS (Tm 88.5°C-89.5°C), e solo i 4 *M. tuberculosis* si sono amplificati con i primers specifici TBR-TBF (Tm 86°C-87°C).

Conclusioni. La *multiplex-PCR* ci sembra più completa riuscendo a evidenziare anche le infezioni da MNT grazie ai primers ITS specifici, e con la messa a punto in *Real-Time* si ridurrebbero ulteriormente i tempi diagnostici.

142

VALUTAZIONE DEL SISTEMA MOLECOLARE *SeptiFast*[®] NELL'IDENTIFICAZIONE DI MICRORGANISMI RESPONSABILI DI SEPSI

Pagani E.¹; De Fina G.¹; Moser B.²; Pagani L.³; Cavattoni I.⁴; Fumiani M.⁵ e Larcher C.¹

¹Laboratorio di Microbiologia e Virologia,

²Dipartimento di Terapia Intensiva,

³Divisione di Malattie Infettive

⁴Dipartimento di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo Azienda Sanitaria dell'Alto Adige, Comprensorio Sanitario di Bolzano, via Boehler 5, I-39100 Bolzano,

⁵Field Scientific Specialist, Roche Diagnostics SpA, via G.B. Stucchi 110, 20052 Monza (MI)

Introduzione. Lo studio si è proposto di valutare potenzialità e affidabilità del sistema *SeptiFast*[®] (Roche Diagnostics) nell'ambito dell'identificazione molecolare di microrganismi coinvolti nell'eziologia delle sepsi, al fine di favorire l'individuazione di terapie mirate in tempi brevi.

Metodi. Nel periodo di prova di tre settimane sono state condotte circa 100 reazioni di RT-PCR, riferite a 30 campioni, di cui 20 reali sospetti d'infezione sistemica, riferiti a pazienti ricoverati nei reparti di Rianimazione, Malattie Infettive ed Ematologia e 10 simulazioni, ovvero prelievi di sangue (una provetta per emocromo da 3 ml) a cui sono state artificiosamente aggiunte sospensioni batteriche, note per carica e specie; nel caso dei sospetti reali, è sempre stata condotta l'analisi dell'emocoltura tradizionale.

Risultati. I risultati ottenuti hanno dimostrato affidabilità per quanto riguarda le caratteristiche di specificità del metodo e implicazioni decisamente interessanti, data l'effettiva possibilità di condurre le indagini in sei ore. Relativamente ai sospetti reali non sono stati evidenziati risultati discordanti tra quanto ottenuto con l'emocoltura tradizionale e il metodo molecolare, che non trovassero una spiegazione plausibile. Relativamente alle 10 simulazioni, il sistema ha dimostrato affidabile specificità e sensibilità, evidenziando corrispondenza tra quanto artificiosamente inoculato e quanto rilevato, ad eccezione di un ceppo di *C. krusei*.

Conclusioni. Sulla base di tali evidenze, abbiamo potuto stabilire l'adequatezza della tecnologia proposta per quello che concerne le nostre esigenze, sia per le caratteristiche di sensibilità e specificità, che in relazione all'effettiva possibilità di fornire un risultato in sei ore dal momento d'inizio del processamento del campione con tempestiva introduzione di una terapia farmacologica mirata.

143

LA MALATTIA DI WHIPPLE: DIAGNOSI DI LABORATORIO

Paglia M.G., Pucillo L.P., Toffoletti A., Visca P.

Unità di Microbiologia Molecolare, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani", IRCCS, Roma.
pagliamicromol@inmi.it

Introduzione. La Malattia di Whipple (MW) è un raro disordine infettivo ad andamento cronico descritto nel 1907 da G.H. Whipple. La MW è causata da un batterio gram positivo, denominato *Tropheryma whipplei* (TW). Il più frequente segno di presentazione è una sindrome da malassorbimento intestinale. I sintomi e i segni della malattia sono polimorfi a seconda di quali organi sono colpiti e dallo stadio della malattia. Nella maggior parte dei casi la diagnosi è fatta attraverso una valutazione istopatologica del tessuto infetto. La terapia antibiotica è essenziale per eradicare il batterio. Le recidive dell'infezione sono possibili, pertanto un programma di follow-up si rende necessario. Con la microscopia elettronica TW si è ritrovato in quantità notevoli nei tessuti affetti. Nel 1997 è stata ottenuta da Schoeden et al. la riproduzione del microrganismo in colture tessutali, utilizzando interleuchina-4 per inattivare i macrofagi.

Metodi. Dal luglio 2000 al marzo 2007 sono stati esaminati 142 campioni biologici di diversa tipologia (liquor, sangue periferico, biopsie paraffinate di intestino e feci) di 54 pazienti pervenuti al nostro laboratorio da reparti ospedalieri e da ambulatori distribuiti sul territorio regionale e nazionale. Il DNA estratto da ciascun campione è stato saggiato con semi-nested PCR avente come bersaglio il gene *hsp-65* di TW.

Risultati. La diagnosi molecolare ha evidenziato nel 10.5% (15/142) dei campioni biologici analizzati la presenza di acido nucleico dell'agente batterico indagato. Ciò ha consentito di accertare in 10/54 pazienti (18.5%) la MW. Per questi pazienti è stata iniziata una appropriata terapia antibiotica. Il programma di follow-up a medio e lungo termine è ancora in corso.

Conclusioni. Abbiamo ottenuto risultati positivi in molti tessuti, feci e nel liquor e la PCR si è dimostrata più sensibile e specifica di altre tecniche. L'applicazione della metodica PCR per la ricerca di TW ne ha modificato il percorso diagnostico. Attualmente è il metodo diagnostico di scelta ed è riconosciuta come il miglior strumento per monitorare la progressione della malattia.

144

STUDIO MOLECOLARE DELLE FARMACORESISTENZE DI *Mycobacterium tuberculosis* IN CAMPIONI RESPIRATORI

Troupioti P.¹, Zara F.², D'Amato V.³, Meacci F.³, Sarassi A.¹, Brerra R.², Pardini M.⁴, Orrù G.⁵, Ciusa M.L.⁵, Pagani L.², Orefici G.⁴, Fattorini L.⁴, Oggioni M.R.³

¹AOV Azienda Ospedaliera Valtellina e Valchiavenna Presidio di Sondalo, Via Zubiani 33, 23039 Sondalo,

² Sez. Microbiologia, Dip. SMEC, Università di Pavia, Via Brambilla 74, 27100 Pavia

³La.M.M.B., Dip. Biologia Molecolare, Università di Siena, Policlinico Le Scotte, Via Bracci, 53100 Siena

⁴Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma,

⁵O.B.L., Università di Cagliari, Via Binaghi 4, 09121 Cagliari.

Introduzione. La resistenza a isoniazide e rifampicina (TB-MDR, multidrug-resistance) costituisce uno dei problemi più importanti nel controllo e trattamento terapeutico della tubercolosi.

Pertanto sono necessari metodi molecolari utili ad una rapida identificazione di tali mutazioni.

Metodi. 139 campioni di escrato, ottenuti da altrettanti pazienti ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera di Sondalo, sono stati analizzati, previa decontaminazione con NALC-NaOH, mediante esame batterioscopico e colturale 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 stato eseguito secondo protocolli standard.

Risultati. I pazienti sono stati suddivisi in "new cases" (NC, 98/139) e "previously treated cases" (PT, 41/139), secondo la definizione dell'OMS. Nel gruppo dei pazienti NC, con i metodi molecolari, la mutazione *rpoB*531 responsabile di rifampicina-resistenza è stata rilevata nel 3% dei campioni esaminati, in 1 campione la mutazione *katG*315 responsabile della resistenza all'isoniazide; tutti sono stati confermati dall'antibiogramma. La PCR real time sul gene *rpoB* ha evidenziato una popolazione batterica mista (allele wild type e allele mutato) in 3 campioni. Nel gruppo dei pazienti PT, è stata identificata la resistenza alla rifampicina nel 61% dei campioni analizzati, mentre nel 63% la resistenza all'isoniazide. Il 51% dei campioni è risultato MDR. L'antibiogramma ha fornito risultati concordanti. La presenza di una popolazione batterica mista è stata rilevata soltanto in 1 campione.

Conclusioni. L'analisi dei risultati ottenuti evidenzia una ottima concordanza tra i dati clinici e microbiologici e le caratterizzazioni molecolari. L'utilizzo di test rapidi si è dimostrato di facile applicazione al fine di monitorare l'andamento delle farmacoresistenze di *M. tuberculosis*.

145

DIAGNOSTICA MOLECOLARE DELLE BATTERIEMIE IN ONCOEMATOLOGIA

Pasanisi G.¹, Maggio G.¹, Leo L.¹, De Vito F.¹, Pavone E.², Lobreglio G.¹

¹UOC Medicina di Laboratorio, ²UOC Ematologia e Centro Trapianti di Midollo Osseo - A.O. "Card. G. Panico" Tricase (Lecce)

Introduzione. Unitamente all'accuratezza della Microbiologia moderna, i recenti indirizzi di management delle patologie infettive richiedono informazioni sulla eziologia microbica in tempi più brevi soprattutto per i complessi quadri clinici del paziente oncoematologico. Nei rilievi preliminari di seguito riportati sono stati messi a confronto i risultati ottenuti mediante un metodo molecolare recentemente disponibile, in grado di evidenziare batteri e miceti di più frequente riscontro nei quadri batteriemici, e quelli dalle emocolture da pazienti oncoematologici al fine di poter delineare il potenziale diagnostico molecolare.

Metodi. A confronto i rilievi eziologici in 114 eventi febbrili oncoematologici su campioni di sangue periferico mediante PCR Real-Time multiplex LightCycler SeptiFast (Roche) con quelli delle emocolture mediante Bact/ALERT (BioMérieux).

Risultati. La concordanza stimata dei due metodi è stata pari a 82,5%. Positività genomiche discordanti venivano evidenziate per *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens* e *P. aeruginosa*; tra i miceti un caso, clinicamente e radiologicamente confermata, per *A. fumigatus*. La PCR Real-Time in studio non ha potuto evidenziare un caso di *Cellulomonas* spp ed uno di *M. morgani* (microrganismi non previsti nel pannello). Il metodo molecolare ha evidenziato sensibilità e specificità rispettivamente del 100% e di 80,6%; valori predittivi positivo e negativo rispettivamente pari a 35,5% e 100%.

Conclusioni. Fatta necessaria la prudenza metodologica nella diagnosi delle batteriemie soprattutto nel paziente oncoematologico, il metodo molecolare in studio ha evidenziato una buona concordanza con l'emocoltura, la rilevazione di patogeni a crescita lenta o difficile, una tempestività nella identificazione e l'elevato valore predittivo negativo. Di contro, la specificità dell'applicazione molecolare merita ulteriori approfondimenti nei quadri clinici, di profilassi/terapia, dei siti settici in altri distretti. Di non secondaria importanza, la possibilità di vedere implicati microrganismi non rilevabili dai metodi molecolari e comunque i limiti delle tecniche molecolari per lo studio dell'antibioticoresistenza invitano ad affiancare alla microbiologia colturale i metodi molecolari.

146

COAMPLIFICAZIONE DELLE REGIONI 5'UTR E CORE DI HCV E RIDEFINIZIONE DEL GENOTIPO: RISULTATI CLINICO-TERAPEUTICI

Pegoraro F., Alliod S., Montanera P.G., Falcone P.

ASL Valle d'Aosta S.C. Microbiologia, Via G. Rey 5, I I 100 Aosta

Introduzione. Il confronto di numerosi isolati di HCV ha permesso di dimostrare l'esistenza di gruppi di virus che presentano un livello di divergenza tra le loro sequenze genomiche pari al 35% circa (genotipi). Sono stati identificati 6 genotipi virali principali che si suddividono a loro volta in sottotipi con livelli di divergenza inferiori e pari a circa il 20%.

L'infezione di tipo 1b si associa più frequentemente a forme gravi di malattia, quali la cirrosi e il tumore, sia per una maggiore aggressività del virus sia per un effetto "coorte" e cioè una maggiore persistenza del virus in circolo, seppure sottoposta a terapia antivirale. La coamplificazione della regione al 5'UTR e core consente la discriminazione tra i due sottotipi 1a ed 1b e anche la variante 6cl.

Metodi. Sono stati analizzati 40 campioni di genotipo 1 indeterminato. Il plasma dei campioni conservato a -70°C è stato sottoposto ad estrazione dell'RNA utilizzando il kit Ampliprep di Roche e successivamente amplificato con il kit Versant HCV Amplificazione 2.0 di Siemens su thermal cycler AB2400. L'amplificato è stato conservato a -20°C ed il genotipo è stato determinato con il kit Versant HCV genotipo 2.0 di Siemens.

Risultati. Tutti i 40 campioni analizzati sono stati correttamente discriminati nel sottotipo, in particolare modo il 95% è risultato appartenente al genotipo 1a ed il restante 5% all'1b.

Conclusioni. Una definizione immediata e precisa del genotipo consente l'applicazione di protocolli terapeutici più mirati evitando la somministrazione di dosi maggiori e per tempi prolungati di interferone e ribavirina, sempre in accordo con i dati clinici e citologici. I pazienti con genotipo 1 indeterminato vengono infatti preventivamente sottoposti a protocollo terapeutico per genotipo 1b considerato più aggressivo e farmaco-resistente. Ne consegue che tale determinazione migliora l'appropriatezza terapeutica, a favore del paziente, ed evita il consumo inappropriato di farmaco.

147

PSEUDOMONAS AERUGINOSA E METALLO- β -LATTAMASI IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA: PREVALENZA E PERSISTENZA

Pollini S.¹, Mugnaioli C.¹, Campana S.², Ravenni N.², Neri A.S.², Taccetti G.² e Rossolini G.M.¹

¹Sezione di Microbiologia, Dip. di Biologia Molecolare, Università di Siena, Italia.

²Centro Fibrosi Cistica, Dip. di Pediatria, Università di Firenze, Italia.

Introduzione. L'acquisizione e la diffusione in isolati di *Pseudomonas aeruginosa* delle metallo- β -lattamasi (MBL) rappresenta una notevole problematica in ambito clinico; isolati produttori di MBL sono stati descritti in epidemie ospedaliere, ma le conoscenze sulla loro diffusione in pazienti con Fibrosi Cistica (FC) risultano ancora limitate. Lo scopo del lavoro è stato quello di studiare la prevalenza delle MBL in ceppi di *P.aeruginosa* da FC, e di analizzare la persistenza nel tempo, la clonalità dei ceppi MBL-positivi ed il contesto genico dei determinanti di resistenza.

Metodi. 44 ceppi di *P.aeruginosa* resistenti ai carbapenemi, provenienti da 39 pazienti cronicamente colonizzati in cura presso il Centro FC di Firenze, sono stati analizzati per la produzione di MBL attraverso E-test e saggi spettrofotometrici. I geni MBL sono stati analizzati mediante ibridazione, PCR e sequenziamento del DNA. In caso di positività per MBL, sono stati analizzati gli isolati retrospettivi dallo stesso paziente. La clonalità dei ceppi MBL-positivi è stata analizzata mediante genotipizzazione (RAPD/PFGE).

Risultati. La produzione di MBL è stata rilevata in 2 dei 44 (5%) isolati, provenienti da 2 differenti pazienti. Gli isolati MBL-positivi possedevano due distinte varianti del gene *bla_{VIM}*, identificate come *bla_{VIM-1}* e *bla_{VIM-2}*. L'analisi degli isolati retrospettivi dei due pazienti ha mostrato la persistenza dei determinanti *bla_{VIM-1}* e *bla_{VIM-2}* per sei e otto anni rispettivamente. L'analisi genotipica ha stabilito la clonalità degli isolati *bla_{VIM-2}*-positivi mentre gli isolati *bla_{VIM-1}*-positivi mostravano una maggiore variabilità genetica. Le due varianti geniche sono risultate parte di due distinti integroni di classe 1.

Conclusioni. Due varianti del gene *bla_{VIM}* sono state isolate in ceppi di *P.aeruginosa* da pazienti con FC cronicamente colonizzati. La diffusione di geni MBL in *P.aeruginosa* da pazienti con FC è un fenomeno allarmante che può avere importanti implicazioni di tipo terapeutico.

Si ringrazia la Fondazione Fibrosi Cistica per il suo contributo (FFC#14/2006).

148

ANALISI DI CEPPI DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLATI DA PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

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

¹Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano";
Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università di Napoli "Federico II".

²Dip. di Pediatria; Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università di Napoli "Federico II".

Pseudomonas aeruginosa (PA) è un microrganismo gram-negativo ambientale, responsabile di infezioni in soggetti affetti da fibrosi cistica (FC). In questi pazienti, il microrganismo acquisito casualmente dall'ambiente, presenta inizialmente una chemiosensibilità variabile e un fenotipo non mucide; tuttavia, dopo diversi trattamenti terapeutici appaiono varianti multi-resistenti con fenotipo mucoido. I ceppi evidenziano anche una spiccata capacità di formare biofilm e, in particolare, il gene *pilA*, coinvolto nella biosintesi del pilo e nei meccanismi di quorum-sensing, è indispensabile alla formazione del biofilm.

In questo lavoro sono stati confrontati ceppi di PA isolati con frequenza trimestrale dagli espettorati di pazienti FC colonizzati cronicamente. I ceppi sono stati identificati e sottoposti a test di chemiosensibilità. Le relazioni clonali fra gli isolati sono state stabilite mediante PFGE, dopo digestione con *SpeI*.

La caratterizzazione molecolare dei ceppi in analisi ha evidenziato che, i pazienti del Centro di Fibrosi Cistica del Policlinico "Federico II" sono colonizzati da ceppi di PA non correlati tra loro. Dati precedenti avevano evidenziato che ceppi differenti di PA erano comunque caratterizzati da geni *pilA* dello stesso gruppo. L'attenzione è stata quindi focalizzata su tre ceppi caratterizzati da geni *pilA* e profili di antibiotico-sensibilità differenti. Da un punto di vista fenotipico due di questi ceppi si presentano mucoidi, mentre il terzo assume fenotipo mucoido dopo alcuni isolamenti. L'analisi del gene *pilA*, però, mostra solo in un caso la presenza di un gene coinvolto nella glicosilazione del pilo. L'analisi mediante PFGE ha dimostrato che due di questi pazienti sono cronicamente colonizzati con isolati appartenenti allo stesso "lineage", mentre il terzo ceppo aveva subito mutazioni nel profilo di restrizione.

L'infezione in pazienti FC da parte di microrganismi multi-antibiotico resistenti è un importante aspetto da monitorare e la caratterizzazione molecolare è in grado di dare importanti informazioni riguardanti lo "stato" del ceppo e la sua diffusione.

149

ASPETTI MICROBIOLOGICI DELLA FIBROSI CISTICA NELL'ESPERIENZA DI BERGAMO: PERIODO 2003 - 2007.

Raglio A., Arosio M., Grigis A., Vailati F., Passera M., Goglio A.

USC Microbiologia e Virologia, A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo.

Obiettivo. Lo scopo del presente lavoro è descrivere le caratteristiche microbiologiche dei microrganismi isolati dai pazienti affetti da Fibrosi Cistica e, nella realtà di un laboratorio ospedaliero di Microbiologia, la performance e le indicazioni alla identificazione dei metodi fenotipici tradizionali e del più recente sequenziamento del genoma batterico.

Metodi. Nella nostra routine diagnostica le metodiche adottate prevedono la colorazione al Gram, le caratteristiche di crescita e le indagini biochimiche manuali e/o automatizzate (gallerie API - VITEK 2, *bioMerieux*). 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).

Risultati. Sono stati esaminati 37 pazienti, età compresa tra 1-30 anni, dei quali 15 sono stati sottoposti a trapianto polmonare. I campioni esaminati sono stati complessivamente 495 ed in particolare 428 respiratori (86.5%), 46 secrezioni purulente e 21 liquidi. Di questi oltre il 95% sono risultati positivi. In tutti i pazienti sono stati isolati microrganismi conosciuti come patogeni nella Fibrosi Cistica: *P. aeruginosa* 25 (49%), *S. maltophilia* 5 (9.8%), *B. cepacia* 3 (5.9%), *A. xylosoxidans* 5 (9.8%), *S. aureus* 5 (9.8%), *S. marcescens* 1 (2%) e *Aspergillus* spp. 7 (13.7%). Si è giunti ad una identificazione degli isolati con i metodi tradizionali in 33 casi (64.7%), nei rimanenti 18 (35.3%) che presentavano difficoltà interpretative (caratteristiche morfologiche e/o biochimiche) si è proceduto ad una identificazione con il kit MicroSeq 500. 3/18 (17%) risultavano comunque correttamente identificati con i metodi tradizionali mentre per 15/18 (83%) è stato necessario il sequenziamento.

I nostri dati evidenziano inoltre la presenza di ceppi di *P. aeruginosa* e *B. cepacia* complessivamente resistenti.

Conclusioni. Il sequenziamento del gene 16S rRNA ha rappresentato un valido supporto per una corretta e rapida identificazione dei microrganismi responsabili di Fibrosi Cistica altrimenti non identificati con i metodi tradizionali (29.4%) anche se in 3 casi (5.9%) l'indagine molecolare non ha dissipato completamente i dubbi interpretativi. Un aspetto non trascurabile sono i costi relativamente contenuti del kit MicroSeq 500 che lo rende facilmente applicabile nei laboratori di Microbiologia con esperienza nell'utilizzo delle indagini molecolari.

150

IMPIEGO DI METODI MOLECOLARI (16S-RNA) PER L'IDENTIFICAZIONE DI AGENTI INFETTIVI RESPONSABILI DI INFEZIONI CATETERE-CORRELATE IN PAZIENTI EMODIALIZZATI

Cazzavillan S*, Verbine A°, D'Amore E.G.S*, Furlan F^., Grillone R^., Zoppelletto M.^, Ronco C.°, Rassu M.^

*U.O. Anatomia Patologica, ° Dipartimento di Nefrologia,

^U.O. Microbiologia e Virologia, Ospedale S.Bortolo, Vicenza

Riportiamo un metodo semplice e universale sviluppato per la ricerca ed identificazione di microrganismi a lenta crescita o inusuali che possono causare infezioni catetere-correlate. L'applicazione di questo protocollo ha permesso di identificare *Methylobacterium spp*, non identificabile con i metodi convenzionali. È stata utilizzata una estrazione del DNA con metodo Qiagen, impiegabile sia per i batteri che per i funghi; il DNA estratto da una coltura di bacilli G-, a lenta crescita (7 giorni), coltivabile su terreno Sabouraud con crescita ottimale tra 25-30°C senza sviluppo a 37°C con colonie mucose di colore rosa, identificato biochimicamente come *Rhodotorula*, è stato amplificato con 2 coppie di primers universali. I primers utilizzati per i funghi sono stati ITS1 e ITS4 (circa 500 bp) che riconoscono una regione dell'rRNA fungino, mentre per i batteri sono stati utilizzati 355F e 910R che amplificano una regione di 540 bp del gene 16SrRNA. L'amplificazione con ITS1-ITS4 è risultata negativa, mentre è stato amplificato il DNA batterico. Dopo elettroforesi e purificazione dal gel, i prodotti di PCR sono stati sequenziati; i risultati sono stati confrontati con le sequenze pubblicate sulla banca dati BLAST e l'agente è stato identificato come *Methylobacterium spp*, batterio ambientale isolato da acqua potabile clorinata e da liquidi di dialisi.

Il largo impiego di cateteri in pazienti dializzati aumenta il rischio di colonizzazione e/o infezioni da microrganismi che possono produrre biofilm. Molte specie di micobatteri, actinomiceti, microrganismi a lenta crescita e lieviti presentano caratteristiche biochimiche e morfologiche che non consentono una buona identificazione con i metodi biochimici disponibili in commercio. Dal momento che tutti i microrganismi possiedono una copia del gene codificante per l'rRNA, che contiene sequenze conservate e variabili, questo consente di differenziare e di caratterizzare tassonomicamente l'agente infettivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferrer C, et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. J.Clin:Microbiol 2001; 39(8):2873-2879

151

IDENTIFICAZIONE RAPIDA CON PCR REAL TIME DI MRSA E VRE ISOLATI DA CAMPIONI CLINICI

Ricci L., Murru G., Varini R., Guidetti C., Vecchia L.

Laboratorio di Microbiologia A.O.S.M.Nuova, Reggio Emilia

Introduzione. Il gold standard per individuare la meticilino-resistenza è la ricerca del gene *mecA* che caratterizza la resistenza di *S. aureus* verso gli antibiotici β -lattamici incluse le cefalosporine e carbapenemi. La ricerca dei geni *VanA* e *VanB* caratterizza la resistenza acquisita da *Enterococcus spp* verso la vancomicina.

Scopo del lavoro è valutare l'accuratezza del test PCR real time nella ricerca dei geni che codificano per tali resistenze.

Metodi. Abbiamo utilizzato i test: LightCycler® MRSA e LightCycler® VRE per la ricerca rispettivamente del gene *mecA* e dei geni *VanA* e *VanB* da isolati batterici di *S.aureus* e di *Enterococcus spp.* provenienti da infezioni localizzate in varie sedi di pazienti ospedalieri. Contemporaneamente tutti gli stipiti sono stati sottoposti ai test tradizionali d'individuazione di resistenza verso l'oxacillina per gli MRSA (n=50) ed alla vancomicina per i VRE (n=14). Per valutare la specificità del metodo, sono stati analizzati anche 25 isolati di *S.aureus* coagulasi negativi e 25 di Enterococchi vancomicina- sensibili.

Risultati. L'applicazione del metodo PCR real-time ha consentito di ottenere un'identificazione dei ceppi MRSA e VRE in tempi molto rapidi, circa 3 ore, rispetto alle 24-48 ore impiegate per l'esecuzione dei test tradizionali. Confrontando i risultati ottenuti con entrambi i metodi abbiamo riscontrato una correlazione del 100%: infatti gli stipiti in cui è stata dimostrata la presenza dei geni *VanA* e *VanB* e *mecA* risultavano resistenti agli antibiotici testati in vitro (oxacillina, vancomicina). Viceversa i batteri oxacillina e vancomicina-sensibili non contenevano i geni suddetti.

Conclusioni. Il nostro studio ha dimostrato che il sistema LightCycler® è efficace per l'identificazione in tempi molto rapidi di MRSA e VRE. Ne consegue un referto tempestivo che facilita l'ottimizzazione della terapia e la messa in atto di tutti i meccanismi idonei al controllo delle infezioni e prevenzione di diffusione di questi patogeni.

152

RISULTATI PRELIMINARI RELATIVI ALL'IMPIEGO DI PCR REAL TIME NELLA DIAGNOSTICA PRECOCE DELLA SEPSI

Ricci L.,¹ Murru G.,¹ Varini R.,¹ Gabbi E.,²
Salsi P.,³ Guidetti C.,¹ Vecchia L.¹

¹Laboratorio di Microbiologia,

²U.O. Malattie infettive,

³U.O. Terapia Intensiva e Rianimazione

A.O.S.M. Nuova Reggio Emilia.

Introduzione. Nella nostra Azienda Ospedaliera è in essere, già dal 2006, un progetto dal titolo:

“Anticipazione diagnostica della sepsi”. Il gruppo di professionisti coinvolti ha il compito di migliorare la diagnostica della sepsi che causa elevata mortalità. A tal fine abbiamo implementato nel nostro laboratorio la ricerca di batteri e funghi su sangue, con tecnica PCR real-time (SeptiFast, Roche Diagnostics). I risultati ottenuti dal SeptiFast sono stati comparati con quelli dell'Emocoltura.

Metodi. Sono stati analizzati 34 pazienti con sospetto di sepsi provenienti dai reparti di: malattie infettive, rianimazione, medicina interna e neonatologia. I campioni di sangue destinati all'analisi con SeptiFast sono stati raccolti contemporaneamente a quelli utilizzati per l'Emocoltura: 3 ml (adulti) e 1,5 ml (neonati) in K- EDTA, 10 ml (adulti) e 1-3 ml (neonati) in flaconi BACTEC.

La PCR real-time è stata eseguita mediante l'utilizzo del sistema Light Cycler SeptiFast. Per l'esecuzione dell'Emocoltura è stato utilizzato il sistema BACTEC (Becton Dickinson).

Risultati. Il test SeptiFast ha mostrato una sensibilità maggiore del 16% di quella della coltura. La concordanza tra i due metodi è risultata pari al 84%.

La maggior sensibilità del test SeptiFast si riferisce alla rilevazione di miceti lieviti (formi) (*Candida albicans*), e di batteri gram negativi non riscontrate con l'Emocoltura.

Tutti i risultati positivi correlavano con il dato clinico. I soggetti esaminati erano selezionati dal medico richiedente sulla base di un forte sospetto di sepsi (marcati segni di SIRS e positività elevata dei marcatori biochimici come la procalcitonina).

Conclusioni. Dai dati preliminari il test mostra come aspetti positivi:

- consente la diagnostica in giornata della ricerca di batteri e funghi su sangue.
- buona accuratezza.

Come aspetti negativi:

- un pannello ridotto di specie identificabili.
- costo elevato.

Riteniamo che il SeptiFast apra un nuovo scenario in tema di diagnostica batterica e fungina ed auspichiamo uno sviluppo del sistema.

153

RAPIDA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA MYCOBATTERI ATIPICI: UTILIZZO DEI KIT ARNIKA SU CAMPIONI RESPIRATORI.

Rossi R.¹; Mengoni F.¹; Sauzullo I.¹; Lichtner M.¹; Chiarini F.²;
Vullo V.¹.

¹ Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali, Università “La Sapienza” di Roma.

² Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università “La Sapienza” di Roma.

Introduzione. La diagnosi di infezione da Mycobatteri atipici a tutt'oggi richiede tempi lunghi di risposta, a causa del lento sviluppo in coltura di questi microrganismi. Inoltre, per la tipizzazione, è necessaria la crescita delle colonie in coltura. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare, direttamente su campioni di espettorato, l'affidabilità dei kit Arnika per la tipizzazione dei Mycobatteri atipici.

Metodi. È stato utilizzato il kit GenoType CM (Arnika), che si basa sul principio dell'ibridazione inversa. Il campione di espettorato è stato decontaminato e centrifugato. Successivamente è stato risospeso in 0.1 ml di acqua sterile procedendo, poi, all'estrazione del DNA batterico. Dopo un'incubazione di 20 minuti in bagnomaria a 95°, il campione è stato sonicato per 15 min e quindi centrifugato, in modo da ottenere il DNA nel sovrantante. Si è quindi proceduto ad allestire una PCR come da protocollo del Kit, aumentando da 20 a 30 il numero di cicli.

Risultati. Sono stati analizzati 4 campioni. In 3 di questi si aveva un forte sospetto clinico di infezione da Mycobatteri atipici. Un paziente era in terapia antitubercolare, senza ricevere beneficio. I risultati del nostro studio hanno confermato in tutti e 4 i campioni la presenza di Mycobatteri atipici; in particolare in due pazienti veniva individuato *M. peregrinum*, in uno *M. gordone* e nel quarto, già in terapia senza beneficio, *M. intracellulare*.

Conclusioni. La possibilità di utilizzare i Kit Arnika non solo su colonie ottenute in coltura, ma anche in espettorato, consente una tempestiva informazione al clinico di grande ausilio non solo per la diagnosi, ma anche per le eventuali scelte terapeutiche.

154

DEVELOPMENT OF A LUX-REAL TIME PCR FOR HUMAN HERPESVIRUS 7 (HHV7) IN PRIMARY CUTANEOUS T CELL LYMPHOMAS.

Sidoti F.¹, Bergallo M.¹, Costa C.¹, Ponti R.², Terlizzi M.E.¹, Astegiano S.¹, Merlino C.¹, Novelli M.², Cavallo R.¹.

¹Dept. of Public Health and Microbiology, Virology Unit, University of Turin,

²Department of Biomedical Sciences and Human Oncology, Section of Dermatologic Oncology, University of Turin, Turin, Italy

Introduction. HHV7 is a CD4-positive T-lymphotropic herpesvirus, the transforming capacity of which has not been established. Few studies have investigated the possible role of HHV7 in Cutaneous T cell lymphomas (CTCL): mycosis fungoides (MF), Sezary syndrome (SS), primary cutaneous CD30+ CTCL, including Lymphomatoid papulosis (LyP). Aim of this study was to develop a real time PCR for quantification of HHV7-DNA and to investigate the role of HHV7 in the context of CTCL.

Methods. To determine sensitivity of the Real-time PCR a clone containing 311 bp of the HHV7-DNA was obtained. The plasmid was then serially diluted, the concentrations were 20000, 2000, 200, 20, 2, and 0.2 copies/ μ l, and a 5- μ l aliquot of each was used as standard. LUX primers are designed with a fluorophore near the 3' end in a hairpin structure. PCR was used to quantify HHV7-DNA in 191 skin biopsies of 147 pts (99M/49F, mean age 63 years): 74 MF, 37 SS, 11 CD30+ CTCL, 25 LyP.

Results. The copy numbers of samples were calculated from the CT values by the software program, Sequence Detector version 1.6 (Applied Biosystems). The sensitivity of this PCR was estimated from the standard curve to be approximately 10 copies/reaction.. HHV7- DNA was detected in 24 tissue samples of 20/147 (13.6%) patients: 10/37 SS, 4/11 CD30+ CTCL, 6/25 LyP and 0/74 MF.

Conclusions. The LUX-Real-time assay described is highly sensitive and specific for the detection of HHV7-DNA and permits quantitative assessment of viral load. No definitive conclusion on HHV7 role in the pathogenesis of primary CTCL can be made, although it is to note that HHV7-DNA was not detected in any of the pts with MF, a less aggressive CTCL.

155

LYTIC CYTOMEGALOVIRUS GENE EXPRESSION ANALYSIS USING RT-PCR

Terlizzi M.E., Bergallo M., Costa C., Sidoti F., Astegiano S., Sinesi F., Cavallo R.

Dept. of Public Health and Microbiology, Virology Unit, University of Turin, Italy

Introduction. The Human Cytomegalovirus (HCMV) is a widespread pathogen that remains latent after primary infection but it can reactivate in immunocompromised conditions such as transplant recipients. HCMV genome is a dsDNA encoding for several genes expressed in different phases of the viral life cycle: immediately early (IE), early (E), involved in viral replication, and late and true late (L, TL) encoding for structural proteins. The evaluation of transcriptional profile of HCMV genes could be utilized for determine the viral reactivation state with potential clinical and therapeutic implications.

Method. Positive controls were obtained from HCMV AD169 (ATCC VR-538) and a clinical isolate amplified on human embryonic lung fibroblasts (HELFL). UL123 (IE, regulatory function), UL54 (E, DNA polymerase), UL65 (L, matrix tegument protein), and UL99 (TL, pp28 protein) were amplified by four RT-PCR assays on 29 clinical samples (polymorphonuclear leukocytes, PMNL) obtained from 14 renal transplant recipients. Reverse-transcription was evaluated by testing for cellular GAPDH transcript on positive control and clinical samples. Results were compared with those obtained with pp65-antigenaemia and viraemia test.

Results. Overall, 24/29 samples (82.8%) were positive for UL123 and UL54 transcripts; 11/29 (37.9%) for UL65, and 17/29 (58.6%) for UL99 transcript. Ten samples (34.5%) were positive for all the transcripts, while 4/29 (13.8%) samples were negative for all the transcripts. The pp65-antigenaemia assay was negative in 5 of 29 samples (17.2%), all of them viraemia-negative. Three of the pp-65 antigenaemia-negative samples (60%) were UL54 positive, one (20%) UL65 and UL99 positive.

Conclusions. Our results confirm that during the course of infection UL123, UL54, UL65 and UL99 transcripts are expressed *in vivo* in circulating PMNL and detection of such transcripts could be useful for discriminating between viral latency and active replication with potential clinical and therapeutic implications.

156

QUANTIZZAZIONE DI HCMV-DNA IN RT-PCR: VALUTAZIONE DI UNA RETTA DI CALIBRAZIONE ESTERNA.

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. Nello studio delle infezioni da HCMV in pazienti trapiantati, è importante effettuare un'analisi di tipo quantitativo al fine di evidenziare la presenza di un'infezione virale attiva. L'approccio diagnostico migliore a tutt'oggi risulta essere la RT-PCR che utilizza, per la quantizzazione del DNA virale nei campioni clinici, una curva standard costruita, in ogni singola seduta, sulla base di quattro campioni con numero di copie genomiche noto. Il presente lavoro è stato svolto allo scopo di valutare metodi alternativi per la quantizzazione del genoma virale. A tale fine gli stessi campioni clinici sono stati analizzati costruendo una retta media con i valori delle curve standard delle singole sedute; inoltre i medesimi sono stati analizzati considerando la pendenza della retta media e tenendo conto della variazione dell'intercetta in ogni singola seduta.

Metodi. Campioni clinici ottenuti da pazienti afferenti all'Unità Trapianti del Policlinico "Umberto I" di Roma, sono stati analizzati mediante HCMV RT-PCR in 96 sedute analitiche tra Gennaio e Dicembre 2006. I dati relativi agli standard (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5) di tutte le sedute sono stati utilizzati per costruire una retta media impiegata per la quantizzazione in doppio delle copie genomiche relative a 200 campioni positivi.

Inoltre è stato considerato elemento indicatore della variazione dell'intercetta lo standard con copie genomiche pari a 10^3 .

I risultati ottenuti con le varie metodiche sono stati analizzati statisticamente mediante test di correlazione, test di regressione e test t di Student.

Risultati. I dati quantitativi ottenuti con i metodi alternativi sono comparabili con quelli osservati mediante la curva standard giornaliera, risultando perfettamente sovrapponibili i valori entro le 10000 copie/ml. Si sono notate differenze, seppur in un range di accettabilità, per le quantità superiori.

Conclusioni. I metodi considerati in tale studio sono risultati essere affidabili al pari della curva standard giornaliera. Pertanto, a nostro parere, possono costituire una valida alternativa nella valutazione quantitativa del DNA virale, garantendo pari sensibilità e accuratezza con minori costi di lavorazione.

157

UTILIZZO DELLA REAL TIME PCR PER LA DIAGNOSI DI ASPERGILLOSI IN PAZIENTI IMMUNOCOMPROMESSI

Zappia E.¹, Musso M.², Orsini S.¹, Ribero S.¹, Ungari S.¹, Bertone F.³, Davit A.³, Gallamini A.³, Mattei D.³, Bracco G.¹

¹S.C. Lab. Analisi - Biologia Molecolare,

²S.C. Lab. Analisi - Proteine ed Allergologia,

³S.C. Ematologia, A.S.O. Santa Croce e Carle - Cuneo

Introduzione. Nei pazienti immunocompromessi l'Aspergilloso Invasivo (AI) è la più comune infezione fungina. La frequenza di mortalità raggiunge il 90% nell'ambito dei trapianti di midollo osseo. La metodologia diagnostica utilizzata fin'ora si basa su tecniche culturali che forniscono una risposta tardiva, e/o sull'antigenemia, tramite dosaggio del galattomannano in ELISA che ha limiti di specificità e sensibilità. Il nostro obiettivo è stato testare l'utilizzo della Real Time PCR.

Metodi. Sono stati raccolti 26 campioni di sangue da 10 pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo. I pazienti sono stati selezionati sulla base dei sintomi clinici per AI, secondo i criteri EORTC.

Il DNA è stato estratto utilizzando il MagNAPure LC DNA isolation kit III (Roche), e l'estrattore automatico MagNAPure LC Instrument (Roche). Il DNA dell'*Aspergillus* è stato amplificato ed analizzato utilizzando il kit Affigene *Aspergillus* Tracer (Cepheid AB) su amplificatore MX3000P (Stratagene) secondo le istruzioni fornite dal produttore. La Real Time PCR è stata standardizzata secondo le direttive EC IVD.

Risultati. 15 campioni su 26 provenivano da 6 pazienti con diagnosi di AI Probabile, mentre i restanti 11 erano di 4 pazienti negativi per diagnosi di AI, presi come controllo. Il valore medio dell'antigenemia nei pazienti controllo era 0.06 ± 0.04 , ed in nessun caso l'analisi in Real Time ha dato esito positivo. Il valore medio dell'antigenemia con AI probabile era 1.7 ± 1 . L'analisi in Real Time PCR con Affigene *Aspergillus* Tracer ha rilevato positività per il DNA dell'*Aspergillo* in 4 dei 6 pazienti AI Probabili.

Conclusioni. La Real Time PCR Affigene *Aspergillus* Tracer sembra essere applicabile alla diagnosi precoce di AI in pazienti immunocompromessi, in combinazione con la valutazione dei sintomi clinici secondo i criteri EORTC.

158

EPIDEMIOLOGIA DI ENTEROBACTERIACEAE E NON FERMENTANTI, ISOLATI NELL'AREA LIGURE.

Regola E., Vito G., Croxatto, Andreotti M., Bandettini R., Bona R., Bottaro L.C., Brunetti R., Dono M., Dusi A., Massucco F., Mazzarello M.G., Marangoni M., Mori M., Piatti G., Reali S., Ricagni L., Ronca A., Santoriello L., Serra D., Marchese A., Debbia E.A.

Gruppo Ligure Gram-negativi, Sezione di Microbiologia - DISCAT, Università di Genova

Introduzione. E' stato condotto uno studio epidemiologico teso ad individuare i membri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* e le specie batteriche non-fermentati maggiormente coinvolti nelle infezioni più comuni, isolati da laboratori del Nord d'Italia.

Metodi. A 12 laboratori, distribuiti omogeneamente nel territorio, sono stati richiesti, per un periodo di circa 2 mesi di collezionare tutti i ceppi gram-negativi consecutivi, appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* e al gruppo dei non-fermentanti. I germi raccolti successivamente da un unico centro sono stati preliminarmente classificati, sulla base della specie, origine del campione, tipo di paziente e reparto.

Risultati. Sono stati collezionati 1878 microrganismi, di cui 899 nosocomiali e 979 comunitari. Il campione maggiormente rappresentato è stato quello delle urine che è risultato in percentuale pari all' 80% del totale, 89,4% dei campioni di origine comunitaria e 67,8% tra i nosocomiali. *Escherichia coli* (63,3% sul totale) è stato in assoluto il patogeno più frequentemente isolato seguito da *Pseudomonas aeruginosa* (9,5 %) e *Proteus mirabilis* (8,9%). I campioni di origine nosocomiale sono stati collezionati prevalentemente da reparti di medicina (19,9%) e residenze protette per anziani (19,5%). Oltre alle urine sono stati analizzati espettorati o broncoaspirati (8%), sangue (4,1) e tamponi da ferite cutanee incluso quelle da decubito (5,3%). *E. coli* e *P. mirabilis* sono stati collezionati principalmente da infezioni delle vie urinarie mentre *P. aeruginosa* appare maggiormente coinvolto nelle infezioni respiratorie.

Conclusioni. L'aumento dell'età media della popolazione alimenta sempre più il numero di pazienti anziani in reparti di medicina generale e residenze protette, che spesso risultano, data la non breve permanenza in tali sedi, sempre coinvolti in infezioni alle vie urinarie. *E. coli* conferma il suo ruolo di maggior patogeno di questa sede anatomica ma con *P. mirabilis* che emerge come germe alternativo.

159

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM BLOOD CULTURES IN A PEDIATRIC HEMATOLOGY-ONCOLOGY AND BONE MARROW TRANSPLANT UNIT

Bandettini R., Ricagni L., Morelli P., Castagnola E.¹, Gatti C., Formiga A., Fenu L., Pellettieri A., Ferrari P., Faraci M. 2, Pescetto L.

Laboratorio Centrale di Analisi;

¹U.O. Malattie Infettive;

²U.O. Ematologia-Oncologia, Ist. G. Gaslini, Genova

Objectives. To evaluate the incidence of resistant bacterial strains in a Pediatric Hematology-Oncology and Bone Marrow Transplant Unit.

Methods. Prospective evaluation of sensitivity to oxacillin for staphylococci and to ceftazidime, amikacin, ciprofloxacin, meropenem for Gram negative strains isolated from blood cultures, independently from clinical relevance. BactAlert automated system (bioMérieux, France) was used for blood cultures. Phoenix automated system (BD, USA) and disk diffusion method were used for bacterial identification and susceptibility testing (according to CLSI).

Results. From January 2003 to December 2006 12416, 729 (6%) positive, blood cultures were evaluated. Coagulase negative staphylococci accounted for 314 strains, 116 (37%) oxacillin-resistant and *Staphylococcus aureus* for 16, 1 (6%) oxacillin-resistant. The proportion of oxacillin-resistant Coagulase negative staphylococci was 28% in 2003, 38% in 2004, 49% in 2005 and 35% in 2006. Gram negatives accounted for 75 strains: 19 (25%) ceftazidime-resistant, 6 (8%) amikacin-resistant, 9 (12%) ciprofloxacin-resistant, 10 (13%) meropenem-resistant.

The proportion of resistant strains was:

Ceftazidime: 6% in 2003, 32% in 2004, 27% in 2005 and 32% in 2006;

Amikacin: 0% in 2003 and 2004, 7% in 2005 and 23% in 2006;

Ciprofloxacin: 0% in 2003, 27% in 2004, 7% in 2005 and 9% in 2006;

Meropenem: 12% in 2003, 4% in 2004, 7% in 2005 and 27% in 2006.

In no case glycopeptide-resistant or intermediate staphylococci or multi-drug resistant Gram-negatives were observed.

Conclusions. The proportion of oxacillin-resistant Coagulase negative staphylococci was low, and near absent for *Staphylococcus aureus*. The overall proportion of resistant Gram-negatives is not high. However, in the last 2 years there was an increase in the proportion of strains resistant to ceftazidime, amikacin and meropenem, even if no strain resulted multi-drug resistant.

160

MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO AMBIENTALE DELLE SALE OPERATORIE DELL'AORN V. MONALDI-NA

Battista R., Corsi G., Russo F., Bernardo M., Di Fiore G., Smeraglia R.

U.O.C. Microbiologia e Virologia
Direttore Prof. R. Smeraglia
A.O.R.N. V. Monaldi- Napoli

Introduzione. Le sale operatorie (13 nella ns Azienda), classificate ad alto rischio infettivo a carico dei pazienti, sono state monitorate, secondo un programma concordato con il Comitato Infezioni Ospedaliere (CIO), per valutare il grado di contaminazione microbica.

Metodi. Per eseguire una valutazione quantitativa della carica batterica totale mesofila, i controlli sono stati effettuati con metodica di campionamento attivo, utilizzando un campionatore monostadio ad impatto ortogonale: Surface Air System (SAS super 100 PBI) e piastre Rodac (OXOID) contenenti Agar+ neutralizzanti. Il 1° campionamento dell'aria viene eseguito prima dell'inizio dell'attività operatoria, il 2° all'inizio dell'attività. Contemporaneamente al 1° campionamento vengono eseguiti i controlli delle superfici, utilizzando le stesse piastre Rodac (Oxoid). Prima del 2° campionamento dell'aria, vengono effettuati i controlli sugli operatori dopo lavaggio chirurgico delle mani. Le piastre vengono incubate a 37° C per 24/48 ore. I risultati della lettura sono espressi facendo riferimento ai valori proposti dall'ISPESL.

Risultati. La lampada scialitica e il pavimento, superfici sulle quali è stata rilevata più frequentemente una contaminazione microbica fuori range, vanno considerate superfici critiche. I controlli delle mani dei 94 operatori sono rientrati tutti nel range di accettabilità. I controlli dell'aria durante l'attività operatoria hanno dato un incremento della carica batterica in modo direttamente proporzionale al numero di persone presenti in sala.

Conclusioni. L'estrema complessità dell'attività che si svolge in sala operatoria richiede costante attenzione da parte di molteplici figure professionali, dal momento che in tale situazione nulla dovrebbe essere lasciato al caso. Il controllo microbiologico ambientale delle sale operatorie si pone come obiettivo quello di accertare la corretta applicazione delle norme comportamentali adottate dal personale sanitario, e valutare l'efficacia delle procedure di sanificazione messe in atto.

161

INFEZIONI DELLA FERITA CHIRURGICA IN PAZIENTI ORTOPEDICI: NOSTRA ESPERIENZA

Carletti M.¹, Mascello D.², Di Felice G.¹, Carducci G.¹, La Rosa G.²

¹Laboratorio Analisi,
²Ortopedia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù,
Presidio di Palidoro

Introduzione. Le infezioni della ferita chirurgica rappresentano ancora oggi una complicanza frequente dell'intervento chirurgico, nonostante siano ben conosciute le opportune misure preventive preoperatorie, intraoperatorie e postoperatorie da adottare al fine di ridurne al minimo l'incidenza. In ortopedia l'incidenza di infezioni della ferita chirurgica è bassa se confrontata con quella di altre specialità.

Metodi. Negli anni 2005 e 2006 sono stati inviati 180 tamponi da ferita chirurgica per coltura, su un totale di circa 3185 interventi di chirurgia ortopedica maggiore e minore. I tamponi sono stati seminati sui terreni CNA, MCK, MSA2, SGC2 (Bio Merieux); le identificazioni e gli antibiogrammi sono stati eseguiti mediante sistema automatico Vitek 1 (Bio Merieux).

Risultati. Dai nostri dati emerge che la percentuale di positività si è mantenuta stabile nei due anni (65% nel 2005 e 69% nel 2006). Nel 2005 sono stati isolati: 3 *Enterococcus faecalis*, 2 *Providencia stuartii*, 23 *Staphylococcus aureus*, 2 *Staphylococcus hominis*, 3 *Klebsiella pneumoniae*, 11 *Pseudomonas aeruginosa*, 14 *Staphylococcus epidermidis*, 4 *Staphylococcus sciuri*. Nel 2006 sono stati isolati: 1 *Candida albicans*, 2 *Enterobacter cloacae*, 3 *Escherichia coli*, 5 *Proteus mirabilis*, 19 *Staphylococcus aureus*, 1 *Staphylococcus hominis*, 2 *Corynebacterium xerosis*, 3 *Enterobacter faecalis*, 4 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Pseudomonas fluorescens*, 12 *Staphylococcus epidermidis*, 5 *Staphylococcus sciuri*. Abbiamo preso in considerazione il profilo di antibiotico-resistenza dello *S. aureus* ed è risultato un significativo aumento di resistenza nei confronti dell'oxacillina (da 17% a 35%) e dell'eritromicina (dal 9% a 35%).

Conclusioni. I nostri risultati confermano i dati riportati in letteratura: i microrganismi più frequentemente isolati sono aerobi gram positivi, soprattutto *S. aureus* e stafilococchi coagulasi negativi che mostrano un'aumento di resistenza nei confronti dei comuni antibiotici, in particolare dell'oxacillina.

162

DISTRIBUZIONE DELLA SENSIBILITÀ E DELLE CLASSI DI RESISTENZA SIMULTANEA AGLI ANTIBIOTICI IN *ESCHERICHIA COLI*

Regola E, Vito G, Croxatto D., Bandettini R, Revello R, Illiberi O, Caliguri P, Dallerà M, Pescarollo A, Morelli P, Annovazzi G, Devoto GL, Perfumo M, Graziani A., Pescetto L, Usiglio D, Capuzzo R, Battola E, Borreanaz T, Marchese A., Debbia E.A.

Gruppo Ligure gram-negativi, Sezione di Microbiologia - DISCAT, Università di Genova

Introduzione. *Escherichia coli* è stato il microrganismo più frequentemente isolato (1189/1878 totali pari al 63,3%) da campioni di materiale patologico in 12 laboratori dislocati in Liguria. Per tale motivo è stato preliminarmente preso come indice della sensibilità agli antibiotici e della presenza concomitante di resistenza ad una o più classi di farmaci.

Metodi. Sulla base degli antibiogramma, il laboratorio centrale ha eseguito una suddivisione dei ceppi considerando la totale sensibilità agli antibiotici o la resistenza ad una o più classi di farmaci (penicilline, cefalosporine I, II, III generazione, carbapenemici, aminoglicosidi, fluorochinoloni, nitrofurani e sulfametossazolo-trimetoprim).

Risultati. La tabella riassume le caratteristiche fenotipiche di *E. coli* che con un andamento del tutto inatteso, non presenta particolari variazioni in termini di percentuali totali, con una distribuzione omogenea, rispetto alle classi di resistenza individuate.

	Nos	RSA	Med	AR	Com	Tot	%
<i>E. coli</i>	496	97	99	300	693	1189	
Sensibili	159	23	42	99	274	433	36,4
1 classe	87	13	11	65	274	213	17,9
2 classi	82	12	14	60	112	194	16,3
3 classi	71	31	17	39	82	153	12,9
≥4 classi	97	18	15	37	99	196	16,5

Nos, nosocomiale, RSA, residenza per anziani, Med, medicina, AR, altri reparti, Com, comunitari.

Il numero dei ceppi, salvo rare eccezioni, isolati dalla stessa sede appaiono essere dello stesso ordine di grandezza sia per resistenza ad una sola classe o a 3 e oltre.

Conclusione. L'evoluzione verso la resistenza appare sempre più imprevedibile, specie in ambiente nosocomiale ove i ceppi tendono a dotarsi di caratteri di resistenza in modo omogeneo. Un'analisi più completa dei dati potrà fornirci indicazioni sull'evoluzione di questo fenomeno.

163

CLUSTERS DI MRSA IN TERAPIA INTENSIVA NEONATALE

Rocchetti A.¹, Lomolino G.², Cavallerio P.³, Fossati L.³

¹ S.O.C. Microbiologia, Settore di Epidemiologia e flussi informativi, Azienda Ospedaliera "SS. Antonio, Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria

² S.O.C. Microbiologia, Settore Igiene Ospedaliera, Azienda Ospedaliera "SS. Antonio, Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria

³ S.C. Microbiologia, Settore di Infezione Ospedaliera Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista di Torino

Introduzione. Analisi dei casi e colture di sorveglianza nei neonati e nel personale in Terapia Intensiva Neonatale (NICU), per il contenimento di un'epidemia da *S.aureus* meticillino-resistente (MRSA).

Metodi. E' stata segnalata un'epidemia da MRSA nel mese di aprile 2007, che ha evidenziato 5 neonati e 4 operatori risultati positivi, mediante colture di sorveglianza. E' stata eseguita un'analisi retrospettiva, dal mese di gennaio 2007, che ha portato all'identificazione di altri 4 neonati con batteriemia da MRSA. Al fronte di questa nuova epidemia, è stato effettuato un isolamento da contatto e in coorte per i neonati ricoverati e bonifica con mupirocina; gli operatori risultati positivi, sono stati allontanati dal reparto e trattati con mupirocina fino a negativizzazione dei tamponi nasali.

Risultati. 9 neonati su 44 ricoverati presso la NICU (20,5%), sono risultati positivi per MRSA: quattro hanno sviluppato batteriemia di cui 1 caso con quadro complicato da endocardite nel mese di febbraio; mentre nel mese di aprile si sono evidenziati 5 neonati e tre operatori, sia medici che infermieri, colonizzati da MRSA. L'analisi dei casi è stata effettuata mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), la quale ha evidenziato due clusters probabilmente correlati da un punto di vista epidemiologico (classificazione secondo Tenover: 2-3 bande di differenza). Nel primo cluster il caso indice, è stato rappresentato da un neonato colonizzato a livello oculare nel mese di febbraio, trasmettendo lo stesso ceppo ad altri 6 pazienti e a 3 operatori. Nel secondo cluster, il caso indice è stato rappresentato da un nuovo paziente, il quale ha successivamente trasmesso il ceppo a un altro paziente e a un operatore.

Conclusioni. Il cluster di MRSA appare epidemiologicamente correlato e a trasmissione crociata. La bonifica con mupirocina e il rinforzo delle precauzioni aggiuntive da contatto nell'assistenza ha permesso il contenimento del cluster.

164

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' ALLA TIGECYCLINA DI ACINETOBACTER BAUMANNII DI RECENTE ISOLAMENTO CLINICO

Giordano A., Penni A., Varesi P., Carattoli A*, Mancini C.

U.O.C. Analisi Microbiologiche B

Azienda Policlinico Umberto I, V.le del Policlinico 155, 00161 Roma

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

Acinetobacter baumannii è un importante patogeno responsabile di infezioni nosocomiali, critiche nei reparti di terapia intensiva. Negli ultimi anni gli isolati di *A. baumannii* di origine nosocomiale mostrano sempre più spesso multiresistenza agli antibiotici, in particolare verso i beta-lattamici ad ampio spettro, gli aminoglicosidi e i fluorochinoloni e ai carbapenemici, considerati fino ad oggi i farmaci di scelta per le infezioni da *Acinetobacter*.

In questo studio sono descritte le caratteristiche microbiologiche e genetiche di una popolazione di ceppi di *A. baumannii* isolati da Aprile 2006 a Marzo 2007 in reparti dell'Azienda Policlinico Umberto I di Roma.

Su tali ceppi è stata saggiata la nuova molecola antibiotica Tigecyclina (Wyeth-Ayerst, Pearl River, N.Y.), una glycylcyclina che mostra una potente attività nei confronti di numerosi batteri.

29 ceppi di *A. baumannii* sono stati isolati da campioni clinici usando le metodiche standard. I test di tipizzazione e di sensibilità sono stati eseguiti con il sistema Vitek 2 utilizzando le card GNB e AST-GN09 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Il saggio della Tigecyclina è stato eseguito con la metodica di diffusione in agar in accordo con le linee guida del CLSI.

I ceppi sono stati caratterizzati a livello molecolare mediante genotipizzazione per RAPD e caratterizzazione degli integroni. La presenza del gene blaOXA58 è stata rilevata in diversi isolati con resistenza a carbapenemici.

I risultati di questo studio preliminare hanno mostrato la presenza di ceppi resistenti ai carbapenemi molto simili a quelli studiati in precedenza, responsabili di outbreaks avvenuti nel 2005. Più recentemente sono stati isolati dei ceppi con fenotipo multiresistente non associato a Oxa-58. Tutti i ceppi hanno mostrato sensibilità per la Tigecyclina aprendo la possibilità di un suo utilizzo nei casi di infezioni sostenute dai ceppi multiresistenti.

165

UTILIZZO DI MRSA ID (BioMerièux) SU CAMPIONI DI PAZIENTI IN REPARTI AD ALTO RISCHIO

Giordano A., Puggioni G., Tosto F., Coletti M., Mancini C.

U.O.C. Analisi Microbiologiche B Azienda Policlinico Umberto I V.le del Policlinico 155 00161 Roma

Lo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) rappresenta una seria sfida per la sanità pubblica in Italia e nel mondo. E' causa comune di epidemie e di infezioni crociate. E' ormai endemico in molte regioni e contribuisce alla morbosità, alla mortalità, e all'aumento dei costi dell'assistenza associata alle infezioni ospedaliere. Nasce quindi la necessità di migliorare e armonizzare i metodi di rilevamento della antibiotico-resistenza, i programmi di sorveglianza e le strategie di controllo. L'adozione di rigorose misure di controllo si è dimostrata efficace, nel ridurre la frequenza di MRSA, anche in esperienze italiane.

Sono stati seminati 105 campioni, di diversa natura di pazienti ricoverati nei reparti di Cardiocirurgia e Neurochirurgia, su "MRSA ID" (BioMerièux) al più presto possibile e incubati per 18-24h a 37°C in termostato. La lettura è stata effettuata secondo le procedure contenute nella scheda tecnica della ditta fornitrice (colonie verdi: MRSA). Se la lettura non evidenziava crescita l'incubazione è stata prolungata di ulteriori 24h. Le colonie che presentavano colore verde sono state identificate biochimicamente con le card GP e la Oxacillina resistenza con le card AST-P535 Vitek2 (BioMerièux).

La valutazione delle piastre "MRSA ID" ha evidenziato su due campioni la presenza MRSA a 18-24h che sono stati confermati con le normali procedure utilizzate in laboratorio. Il colore delle colonie di MRSA è stato da noi classificato come "verde Irlanda". Le colonie che presentavano colorazioni più deboli non si sono rilevate essere *S. aureus* meticillino resistente. Non ci sono state discordanze tra la valutazione con le normali procedure di laboratorio e MRSA ID.

In conclusione il terreno utilizzato è sicuramente attendibile. A nostro avviso nello screening del personale dei reparti a rischio MRSA la semina diretta sulla sola piastra di "MRSA ID" (BioMerièux) è un metodo efficiente e rapido.

166

SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI OSPEDALIERE IN UN REPARTO DI CHIRURGIA: REVISIONE DEI RISULTATI DEGLI ANNI 2005 E 2006

Gualdi P.¹, Collini L.¹, Schinella M.¹, Stefenelli N.², Pasqualini A.³, Mariotti G.⁴

¹U.O. Patologia Clinica,

²U.O. Chirurgia,

³U.O. Farmacia,

⁴Direzione Medica; Ospedale S. Maria del Carmine - P.le S. Maria 6, 38068 Rovereto (TN)

Introduzione. Il problema delle infezioni nosocomiali rimane un aspetto rilevante nell'attuale gestione dell'assistenza sanitaria nonostante le notevoli acquisizioni nella conoscenza dei fattori di rischio e nell'utilizzo di numerosi interventi di prevenzione. Il sistema di rilevazione tramite sorveglianza attiva delle infezioni nosocomiali, utilizzato nel nostro ospedale e gestito dal laboratorio, ha consentito di raccogliere i dati necessari a rilevare le Infezioni Ospedaliere (I.O.) nel reparto di Chirurgia nel periodo 2005-2006.

Metodi. Tramite lo strumento informatico VIGI@ct (bioMerieux) sono stati raccolti i dati riferibili agli anni 2005 e 2006 relativi all'Unità Operativa di Chirurgia che partecipa al progetto di sorveglianza delle I.O. del nostro ospedale. Si tratta di un rilevamento costante e quotidiano che prevede la segnalazione di presunte I.O. basata su dati di laboratorio ed una successiva conferma da parte del clinico tramite la compilazione di un questionario. In un secondo momento un gruppo di lavoro del Comitato per le Infezioni Ospedaliere, costituito da un microbiologo, un farmacista e un chirurgo, ha attuato una revisione critica delle cartelle cliniche dei pazienti con I.O. confermata allo scopo di controllarne l'origine, la profilassi pre-operatoria e la terapia antibiotica attuata.

Risultati. Nel 2005 e nel 2006 sono state segnalate rispettivamente 30 e 28 infezioni definite come ospedaliere al momento della compilazione del questionario che settimanalmente viene consegnato al clinico di reparto. Si tratta di infezioni delle vie urinarie in pazienti portatori di catetere vescicale, sepsi e sepsi CVC correlate, infezioni della ferita chirurgica o addominali post-intervento. Altre, al momento di un attenta revisione delle cartelle cliniche, sono state invece ridefinite come infezioni endogene oppure comunitarie.

Conclusioni. Le infezioni nosocomiali restano un problema frequente e grave nella pianificazione dell'assistenza sanitaria. Un programma di sorveglianza ed una successiva revisione dei dati tramite cartella clinica riesce ad arginare il trend di prevalente aumento. Tuttavia le pratiche assistenziali da adottare per il controllo delle infezioni ospedaliere rappresentano a tutt'oggi una tematica ancora aperta che nell'ambito ospedaliero abbraccia non solo più figure professionali ma anche un gran numero di misure preventive che le stesse sarebbero tenute ad adottare.

167

SORVEGLIANZA ATTIVA IN ICU: FATTORI DI RISCHIO PER ACQUISIZIONE DI MRSA E CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI ISOLATI

Malandrini S. M. I., Montesissa L., Cocca G., Vella P., Grosso S., Saudelli M.

A. O. Fatebenefratelli e Oftalmico, C.so P.ta Nuova 23, 20124 Milano

Introduzione. In questo studio si è cercato di definire a livello locale la dinamica attraverso cui i pazienti ricoverati in ICU divengono portatori o infetti da *S. aureus* meticillino resistente (MRSA), il tasso con cui ciò si verifica, i fattori di rischio e le condizioni fisiopatologiche che accompagnano o favoriscono questo evento. Dei ceppi di MRSA isolati si è poi stilato un profilo di resistenza a diversi antibiotici al fine di caratterizzare i ceppi di origine comunitaria o nosocomiale.

Metodi. Da febbraio a maggio 2007 presso l'A. O. Fatebenefratelli e Oftalmico di Milano è stata condotta una sorveglianza attiva dei pazienti ricoverati presso le UUOO di Anestesia e Rianimazione (SAR) e Medicina d'Urgenza (MedUrg). Si sono inclusi nello studio solo pazienti rimasti in Reparto almeno 48 ore. I dati demografici, i fattori di rischio, l'anamnesi patologica prossima e remota, la terapia antibiotica e gli eventuali interventi chirurgici sono stati registrati su apposita scheda statistica computerizzata. Lo stato di colonizzazione da MRSA del paziente è stato sorvegliato mediante tamponi nasali all'ingresso in Reparto, poi settimanalmente e all'uscita dal Reparto. Lo stato di infezione è stato ricercato mediante analisi delle cartelle cliniche, interviste ai medici curanti, i dati biochimici e microbiologici dei campioni inviati in Laboratorio. I saggi degli antibiotici sono stati eseguiti mediante diluizione in brodo in micropiastra o mediante E-Test, a seconda dell'antibiotico saggiato.

Risultati. In 4 mesi sono stati arruolati nello studio 233 pazienti, di cui 124 femmine (53,2%), 109 maschi (46,8%) con età media di 69,3 anni mediana di 76; 158 ricoverati in MedUrg e 75 in SAR. Sono stati identificati 30/233 (12,8%) pazienti portatori di MRSA: 17/30 pazienti (56%) erano portatori già all'ingresso in Reparto, mentre 13/30 (44%) lo hanno acquisito durante la degenza; 5/233 pazienti (2,1%) hanno sviluppato un'infezione: 3 casi di HAP, 1 HAP + sepsi e 1 sepsi. La lunghezza del ricovero in ICU è il principale fattore di rischio individuato per lo sviluppo dello stato di portatore ($P < 0,01$), l'utilizzo di alcuni devices invasivi (CVC e catetere urinario) mostrano una correlazione meno forte ($P \approx 0,01$), mentre nel nostro studio sembrano aver meno peso l'età dei pazienti ed il Reparto in cui sono ricoverati.

Conclusioni. La sorveglianza dei pazienti ricoverati in Reparti di cura intensiva ha permesso di individuare alcuni fattori di rischio per lo sviluppo di un'infezione da MRSA. La sorveglianza attiva, sebbene impegnativa da un punto di vista organizzativo, dimostra una buona sensibilità nell'individuare i pazienti portatori e un'ottima specificità (sensib.=90%; specif.=100%).

168

VALUTAZIONE DI UN NUOVO TERRENO CROMOGENO SELETTIVO PER LA PRESENZA DI ENTEROBATTERI PRODUTTORI DI ESBL

Mancini C., Danieli D., Penni A., Mingione M., Tosto F., Puggioni G., Varesi P., Giordano A.

U.O.C. Analisi Microbiologiche B Azienda Policlinico Umberto I
V.le del Policlinico 155 00161 Roma

Lo sviluppo delle resistenze batteriche rappresenta una vera e propria emergenza sanitaria. Sappiamo che, all'uso degli antibiotici, i batteri rispondono selezionando microrganismi resistenti. Per questo l'unica prevenzione possibile è quella di impedire l'abuso dei farmaci. Per quanto riguarda i microrganismi gram-negativi le problematiche emergenti sono rappresentate dalla diffusione della produzione di extended spectrum beta-lattamasi (ESBL) negli enterobatteri e che rappresenta un problema di rilevante impatto clinico.

Il presente studio ha voluto valutare la specificità e il valore predittivo delle piastre chromID ESBL (BioMérieux), un nuovo terreno cromogeno selettivo per lo screening degli enterobatteri produttori di ESBL.

Un totale di 162 campioni clinici provenienti da pazienti ricoverati in reparti ad alto rischio, come le terapie intensive e i trapianti, sono stati seminati su chromID ESBL (BioMérieux) oltre che sui comuni terreni di coltura.

Dopo 24-48h le piastre venivano valutate ed eseguiti i relativi isolamenti delle specie responsabili delle infezioni. La tipizzazione e l'antibiogramma degli isolati venivano eseguiti con il sistema Vitek2 (BioMérieux).

La risposta validata è stata confrontata con il risultato ottenuto dal terreno cromogeno per la presenza di enterobatteri produttori di ESBL.

Abbiamo osservato crescita microbica su 36 campioni, di questi 22 erano batteri gram negativi non fermentanti i restanti 14 enterobatteri. Si è riscontrata una sola incongruenza: una *Klebsiella pneumoniae* isolata da uno stesso paziente data dal chromID ESBL come produttrice di ESBL e non confermata da noi.

La rapidità di indicazione della presenza di enterobatteri produttori di ESBL è sicuramente importante sia nel controllo delle infezioni nosocomiali sia nella scelta della terapia antibiotica.

169

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM BLOOD CULTURES IN A NEONATAL INTENSIVE CARE UNIT AND IN A PEDIATRIC INTENSIVE CARE UNIT

Bandettini R., Pescetto L., Morelli P., Gatti C., Formiga A., Fenu L., Pellettieri A., Ferrari P., Mantero E.¹, Tuo P.², Ricagni L.

Laboratorio Centrale di Analisi;

¹ U.O. Malattie Infettive;

² U.O. Rianimazione, Ist. G. Gaslini, Genova

Objectives. To evaluate the incidence of resistant bacterial strains in a Neonatal Intensive Care Unit (NICU) and in a Pediatric Intensive Care Unit (PICU).

Methods. Prospective evaluation of sensitivity to oxacillin for staphylococci and to ceftazidime, amikacin, ciprofloxacin, meropenem for Gram negative strains isolated from blood cultures, independently from clinical relevance. BactAlert automated system (bioMérieux, France) was used for blood cultures. Phoenix automated system (BD, USA) and disk diffusion method were used for bacterial identification and susceptibility testing (according to CLSI).

Results. From November 2005 to October 2006, 2256 blood cultures were evaluated: 606, 91 (15%) positive, from NICU and 1650, 181 (11%) positive, from PICU.

NICU: Coagulase negative staphylococci 62 strains, 46 (74%) oxacillin-resistant;

Staphylococcus aureus, 5 strains, 2 (40%) oxacillin-resistant; Gram negatives, 7 strains, none resistant to any tested drug.

PICU: Coagulase negative staphylococci 120 strains, 93 (77%) oxacillin-resistant;

Staphylococcus aureus, 5 strains, 1 (20%) oxacillin-resistant; Gram negatives, 19 strains, 6 (31%) ceftazidime-resistant, but sensitive to all the other drugs. In no case glycopeptide-resistant or intermediate staphylococci or multi-drug resistant Gram-negatives were observed

Conclusions. The proportion of oxacillin-resistant Coagulase negative staphylococci was similar in both Units, with high-rates of resistance. Oxacillin-resistant Staphylococcus aureus was more frequent in the NICU where an epidemic cluster was observed during the study period. In the NICU there was no strain of ceftazidime-resistant Gram negatives, while they were present in the PICU. This discrepancy is probably related with the different ages and underlying conditions of patients admitted in the 2 Units.

170

DIFFUSIONE EPIDEMICA DI UN CEPPO MDR DI *K. PNEUMONIAE* CTX-M-15 PRODUTTORE IN UNA TERAPIA INTENSIVA NEONATALE

Migliavacca R.¹, Cavigioli F.², Facchini M.³, Spalla M.⁴,
Lista G.², Nucleo E.¹, De Luca C.¹, Pagani L.¹

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

²U.O. Terapia Intensiva Neonatale, Ospedale dei Bambini

"V. Buzzi", via Castelvetro 32, 20154 Milano;

³U.O. Laboratorio Analisi, Batteriologia, Ospedale dei Bambini

"V. Buzzi", Milano, via Castelvetro 32, 20154 Milano;

⁴Servizio Analisi Microbiologiche Fondazione IRCCS "S. Matteo",
p.le Golgi, 27100 Pavia;

Introduzione. Le *extended-spectrum* beta-lattamasi (ESBL) di tipo CTX-M sono state inizialmente descritte nella seconda metà degli anni '80 e la loro diffusione nelle *Enterobacteriaceae*, dal 1995 ad oggi, sta aumentando drammaticamente in molte parti del mondo. In Italia, la ESBL CTX-M-15 è stata riportata prevalentemente in *E. coli* e, più recentemente, in *K. pneumoniae* con una diffusione di tipo regionale. Ad oggi, non sono stati riportati *outbreak* sostenuti da *K. pneumoniae* produttore di CTX-M-15 in reparti di Terapia Intensiva Neonatale (NICU).

Scopo del lavoro. Caratterizzare i ceppi di *K. pneumoniae* produttori di ESBL responsabili di un episodio epidemico avvenuto in una NICU.

Materiali e Metodi. La produzione di ESBL è stata confermata con il test CLSI (linee guida 2007).

Per la caratterizzazione e l'identificazione delle ESBL prodotte sono stati eseguiti IEF, amplificazione con primer specifici del gruppo di beta-lattamasi CTX-M 3-15-22 e sequenziamento. La tipizzazione degli isolati è stata effettuata mediante PFGE (NotI) ed i risultati valutati con il software Fingerprinting II (Bio-Rad).

Risultati. Nel periodo 24 ottobre 2006 - 2 gennaio 2007 presso la NICU dell'Ospedale Buzzi (Milano) sono stati ricoverati 118 pazienti; di questi, 20 (16.9%) sono risultati colonizzati da un ceppo di *K. pneumoniae* ESBL produttore e 3 hanno sviluppato sepsi, con esito infausto in un caso. Un ceppo con le stesse caratteristiche è stato isolato dall'olio dermatologico in uso. Gli isolati erano tutti caratterizzati da multiresistenza con sensibilità solo ai carbapenemi. Lo studio delle beta-lattamasi ha rivelato in ogni caso la produzione di due enzimi con pI 7.6 e 8.6, questo ultimo con attività idrolitica su cefotaxime. Tutti gli isolati sono risultati produttori di CTX-M-15 e tutti clonalmente correlati.

Conclusioni. I risultati di questo studio dimostrano un'ampia circolazione dei ceppi di *K. pneumoniae* produttori di CTX-M-15 e la necessità di una sorveglianza mirata soprattutto in reparti ad alto rischio.

171

VALUTAZIONE "IN VITRO" DI TERRENI AGARIZZATI PER LA RILEVAZIONE DI CEPPI BATTERICI ESBL PRODUTTORI

Vujinovic B., Arighi E., Botta F., Casartelli R., Moretti G.,
Pieretti B., Tettamanti B., Terramocci R.

Laboratorio Analisi Ospedale "Valduce", via Dante 11,
22100 Como (CO)

Introduzione. In seguito alla segnalazione negli ultimi anni di un aumento della prevalenza di microrganismi produttori di β -lattamasi ad ampio spettro (ESBL+), nasce l'esigenza di individuare tempestivamente questi ceppi batterici isolati da diversi materiali biologici, in quanto risultano associati a fallimento terapeutico (multiresistenza vs penicilline e cefalosporine) e ad un peggioramento del quadro clinico del paziente.

Scopo di questo lavoro è quello di valutare nella pratica microbiologica, in associazione ai comuni terreni di coltura utilizzati per l'isolamento dei ceppi batterici da diversi materiali biologici, la sensibilità e la specificità di terreni selettivi in grado di rilevare in prima battuta l'eventuale presenza di ceppi ESBL+.

Materiali e Metodi. Diversi materiali biologici (espettorati, broncoaspirati, broncolavaggi alveolari, urine, emocolture, ecc.) appartenenti a pazienti ospedalizzati presso l'Ospedale "Valduce" di Como e ricoverati in Case di Cura afferenti l'ospedale stesso, sono stati processati e seminati secondo le metodiche in uso nel nostro laboratorio anche sui terreni selettivi per la rilevazione presuntiva di ceppi ESBL+ [Agar chromoID ESBL (bioMérieux) e Agar ESBLA (AES Chemunex, distribuite da Biolife)].

Risultati. In un primo momento abbiamo valutato la sensibilità e la specificità dei due terreni seminando direttamente ceppi batterici di controllo ATCC e ceppi di *Enterobacteriaceae* ESBL+ precedentemente isolati. Questi ultimi sono stati selezionati in base alla segnalazione da parte del sistema automatico Vitek2 Compact ed alla conferma con la prova del doppio disco su terreno Mueller-Hinton agar secondo quanto stabilito dal CLSI. Abbiamo inoltre valutato per entrambi i terreni il fattore di diluizione minimo per la crescita dei presunti ceppi ESBL+ ($\geq 10^4$ UFC/ml). Sono stati esaminati circa 100 pazienti, per diversi materiali biologici, che all'analisi microscopica di screening risultavano positivi per la presenza di bacilli gram negativi.

Conclusioni. Dai dati raccolti è emerso che entrambi i terreni selettivi (Agar chromoID ESBL e Agar ESBLA) mostrano buona sensibilità e specificità per i ceppi batterici ESBL+, in accordo con le segnalazioni del Vitek2 Compact e la prova del doppio disco. Su entrambi i terreni crescono *Pseudomonas spp.* multiresistenti e ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di cefalosporinasi. Questi terreni possono essere affiancati nella routine microbiologica a quelli di uso comune per la rilevazione presuntiva di ceppi ESBL+ al fine di ridurre i tempi di attesa per una terapia antibiotica mirata, soprattutto nei pazienti critici.

172

VAP IN ICU: DUE ANNI DI OSSERVAZIONE

Ranzi ML, Grancini A., Musitelli M., Fiore AV, *De Chiara S., Torresani E.

Laboratorio di Microbiologia,

*Rianimazione Generale "Emma Vecla"

Fondazione IRCCS "Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena"- Milano

Introduzione. La precocità di una terapia antibiotica adeguata in pazienti con VAP incide sulla mortalità che è stimata tra il 33% ed il 50%. Il ruolo del Laboratorio di Microbiologia è indispensabile quindi sia per fornire una epidemiologia locale che consenta di instaurare una terapia empirica più adeguata possibile, sia per una rapida diagnostica con dati di sensibilità specifici del singolo caso.

Materiali e metodi. Nella popolazione a rischio VAP (ventilazione >48h) da gennaio 2005 a dicembre 2006, abbiamo ricercato i casi di VAP probabile, suddividendoli in VAP non a rischio per MDRP (NR-VAP) e VAP a rischio (R-VAP). Individuati i microrganismi responsabili delle due entità, abbiamo valutato la sensibilità di tutti i ceppi degli stessi germi, isolati da broncoaspirati (BAS) nei due anni in oggetto.

Risultati. I pazienti ventilati per più di 48h sono stati 211. Gli episodi di VAP probabile sono stati 22 (10,4%), 7 NR-VAP e 15 R-VAP.

Tabella 1

NR-VAP	N°	%	R-VAP	N°	%
MRSA	3	42.8	MRSA	5	33.3
M. morg.	2	28.6	P. aeruginosa	4	26.7
E. coli	1	14.3	K. pneumoniae	2	13.3
H.influen.	1	14.3	X. maltophilia	2	13.3
			A. baumannii	1	6.7
			Enter. spp	1	6.7

La tabella 1 mostra i patogeni responsabili.

Le percentuali di sensibilità di *S. aureus* sono risultate: Oxa 30%, GM 40%, Va 100%. Le sensibilità di *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *M. morganii* sono risultate rispettivamente (%) ad AN (78,45,86,100,100), a CAZ (51,30,50,90,100), a CIP (50,30,43,70,100), ad IPM (37,100,100,100,100) e a PIP/TXP (81,50,50,100,100). *Enterococcus spp* è risultato sensibile ad AM nel 67% dei ceppi testati, a Va nel 100%, ad HI-GM nel 67% e a LZD nel 100%; *H. influenzae* invece ha mostrato sensibilità del 100% ad AM, CXM e CTX. Infine *X. maltophilia* è risultato sensibile a SXT nel 78% e a LVX nel 100% dei casi.

Discussione. MRSA è il patogeno più frequente sia per le NR-VAP (42.8%) sia per R-VAP (33.3%). *M. morganii* ed *E. coli* (ESBL 0%) complessivamente mostrano una sensibilità alle cefalosporine di III generazione >90%. Nelle R-VAP l'eziologia da gram negativi si presenta nel 60% dei casi e mostra maggiore resistenza: *P. aeruginosa* nel 26.7%, *K. pneumoniae* nel 13.3% e di queste il 50% ESBL produttrice.

173

CONFRONTO DI DUE METODI PER CMV-DNA UTILIZZANDO UN POOL DI CAMPIONI DI SANGUE

Rossi A.¹, Bassani A.¹, Berrone A.¹, Baj A.¹, Milano A.¹, Pulvirenti 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. Il controllo delle infezioni/riattivazioni sostenute da citomegalovirus (CMV) viene eseguito mediante determinazione dell'antigenemia pp65 e/o determinazione quantitativa del genoma di CMV (DNAemia). In questo studio si sono confrontati due metodi per determinazione della DNAemia: Amplicor CMV Monitor [Roche] e CMV PCR Kit [Abbott Molecular].

Metodi. Si è valutata la presenza di CMV in 2.800 campioni sequenziali di sangue intero prelevati con anticoagulante (Vacutainer K2E, BD). Si è valutata l'antigenemia pp65 [IF, Argene] e la DNAemia. Dei positivi si sono conservate aliquote a -80°C. Per lo studio si è impiegato un pool di 12 campioni CMV-positivi di sangue lisato, ciascuno contenente tra 50.000 e 150.000 genomi equivalenti/mL. Aliquote del pool sono state conservate a -80°C. Dopo estrazione del DNA con metodi manuali, gli equivalenti genomici sono stati determinati con il metodo Roche Amplicor e con il metodo Abbott Molecular in diverse sedute analitiche, ciascuna contenente 2-3 replicati.

Risultati. Il metodo Roche Amplicor ha determinato la DNAemia in 79.509 ± 6.625 copie/mL (media \pm ds; n totale = 15; 5 diverse sedute). Il metodo Abbott Molecular ha determinato la DNAemia in 89.574 ± 5.725 copie/mL (media \pm ds; n totale = 16; 8 diverse sedute).

Conclusioni. Il sistema Abbott Molecular ha dimostrato una maggiore sensibilità del sistema Roche Amplicor e una minore variabilità dei risultati sia intra-test che inter-test.

174

UN ANNO DI SORVEGLIANZA MICROBIOLOGICA NEL REPARTO DI TERAPIA INTENSIVA DELL'OSPEDALE S. BIAGIO DI DOMODOSSOLA (VB), A.S.L. I 4

Rossi C.¹, Canale C.¹, Lodolo L.¹, Anchieri P.², Maestrone C.³, Buzzi M.³, Cassani F.³

¹Laboratorio Analisi A.S.L. I 4,

²Terapia Intensiva Domodossola A.S.L. I 4,

³Servizio Farmaceutico A.S.L. I 4

Introduzione. Una appropriata diagnostica microbiologica nella gestione di pazienti ricoverati in Terapia Intensiva (T.I.), ha ricadute positive non solo per una terapia antibiotica mirata, ma anche per la sorveglianza dell'epidemiologia delle infezioni.

Metodi. Sono stati analizzati i risultati relativi agli esami microbiologici eseguiti nell'anno 2006 presso la T.I. periferica e polivalente dell'Ospedale S. Biagio di Domodossola (VB). Nell'anno 2006 sono stati ammessi in T.I. 205 pazienti, sui quali sono stati eseguiti esami microbiologici di routine (broncoaspirato, urinocoltura) una volta alla settimana, oppure al bisogno, in relazione alle condizioni cliniche del paziente.

Nel periodo preso in esame sono state inviate in laboratorio 149 urinocolture e 29 emocolture. Gli esami colturali di aspirato tracheale esaminati nel 2006 sono 208, risultati positivi in 56 pazienti (27%).

Risultati. I referti microbiologici inerenti le colture di aspirato bronchiale, evidenziano una colonizzazione da cocci gram positivi nel 30% dei campioni (in prevalenza *Staphylococcus aureus*), e nel 69% da batteri gram negativi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ed *Enterobacter aerogenes*, i più frequenti).

Lo studio della farmaco sensibilità ha evidenziato che il 50% di *Staphylococcus aureus* presenta il fenotipo MRSA. *Pseudomonas aeruginosa* risulta sensibile ad aminoglicosidi e carbapenemi rispettivamente nel 100% e nel 90% dei casi. Tutti i ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* isolati, risultano essere probabili produttori di beta lattamasi verso piperacillina e ceftazidime.

Lo studio del consumo di antibiotici espresso in DDD% per l'anno 2006, rileva che gli antibiotici più usati nel reparto sono: amoxicillina – acido clavulanico e ampicillina – sulbactam in ragione di una DDD% di 36, i chinolonici e piperacillina – tazobactam, con DDD% rispettivamente di 24 e di 20.

Conclusioni. L'esame microbiologico eseguito con costanza permette di raccogliere dati, tali da poter attivare protocolli di terapia antibiotica empirica, il più possibile aderenti all'epidemiologia di reparto.

175

USO DELLE TECNICHE DI FINGERPRINTING IN SOSPETTA INFEZIONE NOSOCOMIALE DA PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Russo C.¹, Bernaschi P.¹, Manfredini C.¹, Argentieri M.¹, Coltella L.¹, Menichella D.¹

¹U.O. di Microbiologia,

Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù"

- Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico,

- Piazza S. Onofrio 4, 00165 Roma

Introduzione. Le infezioni nosocomiali danno ragione di circa il 12% delle complicazioni ospedaliere in pazienti oncologici, immunosoppressi o trapiantati d'organo. Almeno ¼ dei decessi in Ospedale riconosce come causa le infezioni nosocomiali. Il laboratorista deve implementare la diagnostica con test che consentano la identificazione dell'agente eziologico a livello di specie, di ceppo fino ad una caratterizzazione "individuale". Tale tipizzazione viene definita "fingerprinting" (impronta digitale). Abbiamo confrontato due metodiche genotipiche di recentissima introduzione la f-AFLP e la tecnica rapida su chip rep-PCR (Bacterial Barcode Bio-Merieux) per valutare le potenzialità di questi test in termini di capacità discriminante, rapidità e facilità di esecuzione.

Metodi. Cinque isolati di *P. aeruginosa* provenienti da colture relative a 3 pazienti ricoverati nel Dipartimento di Onco-Ematologia e da 2 colture relative a controlli ambientali, tutti con identico antibiotipo, valutati in corso di sospetto spread nosocomiale.

Risultati. Tecnica di f-AFLP: gli isolati dei pazienti 1 e 2 avevano un profilo tra loro sovrapponibile ma diverso dai profili dei controlli ambientali. Gli isolati da controlli ambientali avevano un profilo tra loro sovrapponibile.

L'isolato del paziente 3 non mostrava alcuna sovrapponibilità né con il profilo degli altri isolati clinici, né con quello dei controlli ambientali.

Tecnica rep-PCR: sono stati ottenuti risultati sovrapponibili a quelli con f-AFLP ma corroborati da analisi statistica utilizzando le matrici *Pearsons Correlation* e *Kullback-Leibler*. Il grado di similarità tra 1 e 2 era superiore al 99%; il grado di similarità tra i due isolati ambientali superiore al 99%; la similarità tra 1 e 2 e gli isolati ambientali era pari all'80%. L'isolato 3 ha mostrato similarità con 1 e 2 pari al 75% e con gli isolati ambientali pari all'80%.

Conclusioni. La caratterizzazione rapida di fingerprinting è un test "salvavita" utile per adottare corrette strategie terapeutiche, contenere lo spread infettivo e individuare la catena del contagio ai fini della prevenzione delle infezioni nosocomiali.

176

INFEZIONI OSPEDALIERE DA GERMI ESBL- PRODUTTORI.

Sala E., Spinelli M., Armitano S., Braga B., Martella E., Petrini P., Quarti C., Tomassini W., Villa L., Cimetti S.¹, Gangemi A.¹, Giana G.

Laboratorio analisi chimico- cliniche e Microbiologia,

¹Ufficio Epidemiologico Aziendale - P.O. Sant'Anna - Azienda Ospedaliera Sant'Anna - COMO

Introduzione. *ESBL* (*Extended Spectrum Beta Lactamases*) sono enzimi responsabili di resistenza a cefalosporine terza generazione e monobattami; non inibiscono cefamicine e carbapenemi. Primi riscontri in *E. coli* e *K. Pneumoniae*, ma sono presenti in quasi tutte le *Enterobacteriaceae*. La presenza di *ESBL* causa fallimento del trattamento antibiotico, qualora sia utilizzata una delle suddette molecole. I primi riscontri di *ESBL* risalgono alla fine anni 70, dal 1983 circolano in Europa e dal 1988 negli USA: nel 2005 circa 200 diverse *ESBL* presenti in microrganismi diffusibili per contatto diretto o per ambiente contaminato.

Metodi. La diagnosi microbiologica della presenza di germi produttori di *ESBL* utilizza sistemi di microdiluzione in brodo e test di diffusione in piastra. Dal 2004 è attiva una sorveglianza delle infezioni ospedaliere a partenza dal laboratorio di microbiologia, basata sul rilievo di microrganismi sentinella, che comprende anche i germi *ESBL*+: sono presentati i dati raccolti dal gennaio 2005 al giugno 2007.

Risultati. Sono stati rilevati 104 germi *ESBL*+ responsabili di infezioni ospedaliere comparse a distanza di oltre 48 ore dal ricovero: 48 nel 2005, 39 nel 2006 e 17 nei primi 6 mesi del 2007; in media 3,5 casi/mese. *E. coli* rappresenta il 47,1%, *P. mirabilis* il 32,7%, *K. pneumoniae* il 15,4%, *K. oxytoca* il 3,8% e *C. freundii* 1%. Materiale di isolamento: urine 72 (69,2%), pus-essudato 17 (16,3%), secrezioni basse vie aeree 6 (5,8%), sangue 3 (2,9%), altri materiali 6 (5,8%). I casi rilevati si distribuiscono nelle diverse UU.OO., maggiormente in Medicina geriatrica 20 casi (19,2%), Chirurgia 13 (12,5%) e Medicina generale 10 (9,6%). La mediana delle età è di 76 anni.

Conclusioni. *ESBL* rappresentano un importante meccanismo di resistenza dei batteri gram-negativi; il loro rilievo consente di governare un fenomeno che è costantemente presente, contenendo quindi la trasmissione delle infezioni da paziente a paziente e ottimizzando altresì l'uso degli antibiotici.

177

INCIDENZA E SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI DA CLOSTRIDIUM DIFFICILE: ESPERIENZA E.O. OSPEDALI GALLIERA DI GENOVA NEL TRIENNIO 2004-2006

Usiglio D.¹, Lanata M.¹, Marrapodi A.¹, Cavanna E.¹, Sansone P.¹, Cenderello N.², Fabbri P.², Nelli M.², Crisalli M.P.³, Tramalloni R.², Cassola G.³, Mori M.¹,

¹ Laboratorio Analisi

² Controllo Infezioni Ospedaliere Direzione Sanitaria

³ Reparto Malattie Infettive

Introduzione. Per verificare l'efficacia del programma di sorveglianza abbiamo analizzato nel triennio i tassi d'incidenza delle infezioni ospedaliere e comunitarie da *Clostridium difficile* e i sospetti cluster epidemici valutando i dati nelle singole aree di degenza in rapporto a numero ricoveri e stagionalità.

Metodi. Ricerca tossine *Clostridium difficile* (Premier Toxins A&B ditta Meridian). Analisi schede compilate dal Gruppo Operativo Comitato Infezioni Ospedaliere per ogni nuovo caso d'infezione.

Risultati. Costante aumento (da 7 a 12,5 casi /1000 ricoveri) dell'incidenza delle infezioni da *Clostridium difficile*. Contenimento delle infezioni ospedaliere: media trimestrale intorno a 5-6 casi / 1000 ricoveri. Un solo picco nel 1° trimestre 2006 con 12,4 casi /1000 ricoveri.

Incremento costante nel periodo in esame delle infezioni comunitarie in media da 3 a 6 casi / 1000 ricoveri per frequente scambio di pazienti di età superiore ai 65 anni tra il nostro Ospedale, RSA e Lungodegenze.

Area Medicine: infezioni ospedaliere costanti ma infezioni comunitarie con un picco nel 2005.

Area Chirurgie: aumento infezioni ospedaliere nel 2006 probabilmente dovuto alla concentrazione di pazienti con più fattori di rischio.

Non è stata dimostrata una stagionalità dell'infezione: picchi d'incidenza si sono verificati in periodi dell'anno diversi nell'arco del triennio studiato.

Conclusioni. Il programma di sorveglianza delle infezioni da *Clostridium difficile* sembra adeguato nel contenere le infezioni ospedaliere ma da migliorare per quanto riguarda la prevenzione dei fattori predisponenti all'infezione, nell'area chirurgica e nel nostro bacino d'utenza esterno.

178

UN SISTEMA PER LA GESTIONE INFORMATIZZATA DELLE EMOCOLTURE TEMPORIZZATE DA CATETERE VENOSO CENTRALE

Venturi N.; Colombo L.; Galbiati E.; Brambilla P.

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

Introduzione. Il sospetto d'infezione ematogena associata all'impianto di catetere venoso (CR-BSI: Catheter-Related Bloodstream Infections) frequentemente comporta la rimozione inappropriata del catetere. Il test per la valutazione del DTP (Differential Time of Positivity) per colture da sangue periferico da catetere rispetto a quello prelevato da vena periferica costituisce un metodo conservativo di riferimento per formulare una diagnosi d'infezione catetere-correlata.

Blot e colleghi (Lancet 1999;354:1071-7) hanno definito che una differenza nel tempo di crescita superiore a 120 minuti è predittiva d'infezione da catetere venoso. Scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare un programma per la gestione informatizzata dei dati relativi alle emocolture temporizzate.

Metodi. Nel laboratorio dell'Ospedale di Desio il sistema automatico di rivelazione microbica per emocolture (BacT/ALERT3D; Biomerieux) in uso è collegato bidirezionalmente al server. Il risultato e l'orario di positivizzazione vengono registrati nel database centrale non appena inviati dallo strumento, insieme ad una serie di informazioni aggiuntive. Essi sono immediatamente disponibili per la consultazione telematica da parte dei medici dei reparti di degenza mediante l'accesso all'Intranet del laboratorio, e sono visualizzabili, per ogni singolo paziente, mediante un'apposita schermata.

Risultati. Dal Dicembre 2005, data di attivazione di questo servizio informatico, al Marzo 2007 sono stati segnalati 176 episodi di sospetta CR-BSI relativi a 89 pazienti.

In 18 episodi su 176 sia la coltura da sangue periferico da catetere che quella prelevata da vena periferica risultavano positive per lo stesso microrganismo, di cui 15 (83.3%; 8.5% del totale) con un DTP > 120 min. Le infezioni risultavano sostenute da batteri Gram positivi in 6 casi (40%), da batteri Gram negativi in 7 casi (46.7%) e da *Candida* spp in 2 casi (13.3%). In 3 episodi (16.7%) il DTP risultava inferiore a 120 min.

Conclusioni. I risultati ottenuti concordano con le più recenti osservazioni sulle CR-BSI. L'archiviazione elettronica dei risultati relativi alle emocolture facilita la sorveglianza delle infezioni nosocomiali CVC-correlate.

179

DUE PIATTAFORME ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DELLA CARICA VIRALE DI HIV-1 A CONFRONTO: bDNA versus Real-time PCR.

Amendola A., Brega C., Zaccaro P., Aleo L., Di Filippo S., Capobianchi M.R.

Laboratorio di Virologia, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani", Roma.

Introduzione. Le *performance* analitiche del metodo COBASAmpliprep/COBASTaqMan (Roche Diagnostics), basato sull'amplificazione della regione *gag* mediante RT-PCR in *real-time* sono state confrontate con quelle del sistema Versant 3.0 (Siemens Diagnostics) che sfrutta l'amplificazione del segnale mediante ibridazione con sonde oligonucleotidiche

Metodi. Confronto eseguito su pannelli standard a titolo noto (BBI Diagnostics) e 90 campioni clinici di plasma [30 ospitano il sottotipo ricombinante di HIV-1 CRF02 (A/G); i restanti 60 campioni sono considerati virtualmente di sottotipo B]. Analisi statistica con metodo di correlazione di Pearson e con il plot Bland&Altman.

Risultati. Nel complesso, il numero di campioni clinici con risultati discordanti riguardo alla positività/ negatività non supera il 6%.

Riguardo agli aspetti quantitativi, il coefficiente di correlazione tra i risultati ottenuti risulta molto elevato, sia con i campioni clinici, sia con i pannelli standard ($r > 0.970$, $p < 0.0001$) e le differenze di misurazione sono statisticamente non significative. Nei campioni CRF02+, i valori ottenuti con *real-time* PCR sono più elevati di quelli ottenuti con bDNA, con una differenza significativa tra le medie pari a $0.245 \log_{10} \text{cp/ml}$ ($p < 0.05$). L'analisi di Bland&Altman evidenzia che tali differenze di misurazione si osservano principalmente nei campioni CRF02+ che contengono una quantità di carica virale compresa fra 3 e $5 \log_{10} \text{cp/ml}$. Invece, nel gruppo di pazienti di sottotipo B, le differenze maggiori si apprezzano intorno a valori elevati di carica virale ($> 4 \log_{10} \text{cp/ml}$).

Conclusioni. Nonostante l'elevata correlazione, i risultati ottenuti con i due metodi non sono sempre sovrapponibili: in genere, il metodo *real-time* PCR misura valori più bassi di HIV RNA per valori medio-alti di carica virale per il sottotipo B, mentre per il sottotipo CRF02 si osserva una sovrastima nell'intero *range* dinamico di misurazione.

E' necessaria una ulteriore sperimentazione per valutare l'impatto sui processi diagnostici, la *performance* su forme varianti di HIV-1 e la eventuale influenza sulle decisioni cliniche.

180

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE RAPIDA DI BATTERI E DI GENI DI RESISTENZA DA FLACONI EMOCOLTURALI: ESPERIENZA PEDIATRICA

Bernaschi P.¹, Manfredini C.¹, Lucignano B.¹, Ranno S.¹, Mancinelli L.¹, Russo C.¹, Menichella D.¹

¹U.O. di Microbiologia, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù"
- Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico,
Piazza S. Onofrio 4, 00165 Roma

Introduzione. La diagnosi di batteriemia e/o sepsi rappresenta a tutt'oggi una sfida microbiologica in termini di accuratezza e rapidità nella identificazione dei germi responsabili di setticemie. I saggi fenotipici biochimici di identificazione e antibiotico-suscettibilità dei microrganismi isolati da flaconi emoculturali positivi prevedono un tempo di refertazione di circa 48 ore. Nel nostro studio, abbiamo valutato un nuovo test molecolare rapido, (GenoType Blood Cultures®-Hain Lifescience) dichiarato in grado di identificare batteri e determinare la presenza dei geni di resistenza *mecA*, *vanA/B/C*. Razionale dello studio è stato quello di valutare l'applicazione del test su emocolture provenienti da pazienti pediatrici afferenti all'Ospedale "Bambino Gesù" e di determinare la riduzione del Turn Around Time (TAT) nella routine del laboratorio microbiologico clinico.

Metodi. Da Settembre a Dicembre 2006 presso la U.O. di Microbiologia dell'Ospedale "Bambino Gesù" i flaconi PEDS PLUS/F Becton Dickinson) rilevati positivi allo strumento BACTEC 9240 sono stati contemporaneamente saggiati con metodo fenotipico (Vitek® 2 - Biomerieux) e molecolare. L'identificazione genotipica GenoType BC è stata eseguita come da istruzioni del produttore. Le discrepanze identificative sono state risolte mediante analisi di sequenza genomica (16s rDNA).

Risultati. Sono state valutate 148 emocolture positive (103 cocci Gram-positivi, 28 bacilli Gram-negativi isolati singolarmente e 14 infezioni miste).

Nella prima parte dello studio il sistema GenoType BC ha correttamente identificato 41/49 cocci Gram positivi (Sensibilità 84%) e 17/17 bacilli Gram negativi (Sensibilità 100%). Dopo ottimizzazione "in house" dell'estrazione del DNA sono stati correttamente identificati 53/53 Cocchi Gram positivi e 11/11 bacilli Gram negativi (Sensibilità e Specificità 100%). Sono state valutate inoltre 14 colture miste; di queste 1 è stata identificata in prima istanza solo dal sistema GenoType BC (*P. aeruginosa* e *S. mapltophilia*) e successivamente dimostrata mediante subcoltura.

Conclusioni. Il test molecolare GenoType BC è risultato di facile e rapida esecuzione (TAT medio 5 ore), utile per la diagnosi rapida di setticemia nel paziente pediatrico.

181

IL SEQUENZIAMENTO GENICO DEL 16S rDNA NELLA DIAGNOSI DELLE INFEZIONI DA BATTERI ANAEROBI

Coltella L., Ranno S., Argentieri M., Russo C., Menichella D.

U.O. Microbiologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù,
Piazza Sant'Onofrio 4, 00165 Roma

Introduzione. I batteri anaerobi sono responsabili di infezioni spesso gravi riscontrabili in diversi siti corporei. L'identificazione attualmente è eseguita con metodi fenotipici, lunghi, laboriosi e non attuabili in tutti i laboratori. La conseguenza è una sottostima dell'incidenza di tali batteri nella pratica clinica.

In questo studio abbiamo valutato l'impatto del sequenziamento di 500bp del gene 16S rDNA nella nostra diagnostica di routine di laboratorio.

Metodi. 152 ceppi di batteri anaerobi, isolati da campioni clinici consecutivamente raccolti da pazienti pediatrici afferenti all'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, sono stati valutati sia con metodi fenotipici (esame morfologico, saggio biochimico miniaturizzato) che con il metodo genotipico del sequenziamento di 500bp del gene 16S rDNA.

Risultati. il 56% dei ceppi in esame ha mostrato piena concordanza identificativa fra i due metodi, fornendo la stessa identificazione; per il 20% dei ceppi la concordanza si è limitata a livello di genere, mentre a livello di specie solo il metodo molecolare è stato in grado di fornire un'identificazione. Nell'11% dei ceppi i due sistemi non hanno mostrato concordanza né a livello di genere né di specie. Nel 13% degli isolati il metodo fenotipico non è stato in grado di identificare il microrganismo anaerobio in esame. Se si analizzano in particolare tre gruppi di batteri anaerobi: i principali patogeni (*B. fragilis group*, *C. difficile* e *Fusobacterium*); il germe endogeno di più frequente isolamento (*P. acnes*); e altri batteri che hanno un ruolo nell'infezione quali: (*Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Veillonella*).

Conclusioni. I nostri risultati confermano che i metodi fenotipici non sono sufficienti nella diagnostica delle infezioni da batteri anaerobi: infatti *P. acnes* risulta l'unico microrganismo anaerobio sempre correttamente identificato dai metodi fenotipici.

Al contrario, il sequenziamento genico rappresenta un valido aiuto nella pratica di laboratorio, permettendo una corretta identificazione dei patogeni anaerobi non soltanto a livello di genere, ma anche a livello di specie.

182

DUE CASI DI MENINGO/ENCEFALITE DA *L. MONOCYTOGENES*: ATTUALITÀ DEL SISTEMA DI SORVEGLIANZA DELLE LISTERIOSI

Boni S.¹, Artioli S.¹, Amodeo C.², Derchi A.², Battola E.³,
Dono M.³

¹U.O. Malattie Infettive;

²U.O. Anestesia e Rianimazione;

³U.O. Analisi; Osp. S. Andrea, La Spezia

Introduzione. La *Listeria monocytogenes* è un piccolo bacillo, riconosciuto come importante fattore di causa di meningiti e sepsi in pazienti immunocompromessi e di devastanti infezioni materno/fetali. La listeriosi sebbene rara, è una malattia preoccupante per l'elevato tasso di mortalità. Le epidemie di listeriosi sono legate alla trasmissione alimentare del bacillo da cibo contaminato. Negli USA ci sono circa 5 casi di listeriosi invasiva per milione di abitanti all'anno, mentre in Italia nel 2004 l'incidenza è stata di 0.7 casi/milione di abitanti. La maggior parte dei casi di malattia dovuti a *L. monocytogenes* è sporadica.

Metodi. Tra aprile 2006 e gennaio 2007, all'ospedale S. Andrea di La Spezia si sono registrati due casi di meningo/encefalite da *L. monocytogenes*.

Risultati. La diagnosi in prima istanza è stata effettuata mediante esame citochimico/morfologico e colorazione GRAM del liquor che si presentava limpido, con cellule mono/polimorfonucleate, con iperprotidorrachia e modesta glicogarrìa; la colorazione invece permetteva di individuare piccoli bacilli GRAM positivi (sebbene rari). La coltura successiva consentiva l'isolamento di *L. monocytogenes* e confermava il sospetto di diagnosi.

Conclusioni. Entrambi i pazienti affetti non sono da considerarsi immunocompromessi e quindi non sembrano far parte di categorie a rischio di listeriosi. Tuttavia è da sottolineare che entrambi vivono in un'area circoscritta ricca di aziende agricole con produzione "biologica". Si ipotizza così una trasmissione alimentare mediante prodotti caseari o ingestione di verdure contaminate. Sicuramente nel nostro caso non si può parlare di epidemia ma di due casi sporadici che hanno in comune la vicinanza territoriale e probabilmente abitudini alimentari legati al contesto territoriale.

Tuttavia, le caratteristiche epidemiologiche/ambientali dei due casi qui descritti, suggeriscono che la prevenzione e il controllo della listeriosi (e la sicurezza alimentare) sono più che mai temi microbiologici attuali.

183

DATABASE DI OGGETTI DIDATTICI RIUTILIZZABILI PER PRODURRE CORSI E-LEARNING PER LA MICROBIOLOGIA

Rossetti R.¹, Masoni M.², Guelfi M.R.², Aharpour N.²,
Conti A.³, Gensini G.F.^{2,4}

¹UO Microbiologia, Spedali Riuniti Pistoia,
P.zza Giovanni XXIII, 51100 Pistoia

²Presidenza Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Firenze,
Viale Morgagni 85, 50134 Firenze

³Dipartimento di Fisiopatologia Clinica,
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Firenze,
Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze

⁴Dipartimento di Area Critica Medico-Chirurgica,
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Firenze,
Viale Morgagni 85, 50134 Firenze

Introduzione. La notevole sovrapposibilità dei "curricula" delle Facoltà di Medicina e Chirurgia italiane induce molto spesso i docenti a produrre *ex-novo* risorse multimediali tra loro simili di cui sarebbe stato possibile evitarne la duplicazione, con evidenti risparmi in termini di tempo e costo.

Il Database di Oggetti Didattici per la Medicina (DOD-Med) è un progetto mirato alla realizzazione di un repository contenente materiale didattico multimediale di elevato livello qualitativo che possa essere riutilizzato gratuitamente per la produzione di corsi e-learning in ambito medico scientifico nel pieno rispetto della normativa sul diritto d'autore.

Metodi. A partire da un Content Management System open-source è stato realizzato un sistema che permette di archiviare oggetti multimediali di varia tipologia (documenti testuali, immagini, file audio e video) e può essere popolato da strutture interessate (Università, Centri di Ricerca, organizzazioni sanitarie) o da singoli soggetti. Tutte le risorse proposte per l'inserimento nel Database vengono sottoposte ad un processo di revisione (peer-review) che consente di migliorare la qualità degli oggetti didattici pubblicati.

Risultati. Il Database raccoglie sistematicamente risorse e materiali didattici organizzati per area disciplinare e ricercabili per parole chiave. Le risorse contenute nel Database sono liberamente disponibili tramite l'utilizzo di licenze tipo "Creative Commons" da coloro che intendono produrre corsi e-learning. Attualmente le discipline attivate sono: Microbiologia Clinica, Istologia, Medicina Nucleare e Patologia Generale.

Conclusioni. La diffusione progressiva della formazione a distanza, sia nel campo dell'istruzione sanitaria di base (corsi di laurea, scuole specialistiche, ecc.) sia nel campo dell'educazione continua in Medicina, rende assai utile la presenza di risorse didattiche di alto livello qualitativo liberamente riutilizzabili nella produzione di corsi e-learning specie per quanto riguarda la Microbiologia Clinica.

184

USO COMBINATO DI ANALIZZATORI AD ACCESSO RANDOM ED A MICROPIASTRA PER LA SIEROLOGIA MICROBIOLOGICA

Moroni A., Marangoni A., Biagi M., Della Bella E. Savioli F., Cevenini R.

Laboratorio di Microbiologia, Policlinico S. Orsola
- Malpighi, Bologna

Introduzione. In questi ultimi anni la tendenza ad accorpare i piccoli laboratori ha portato ad un aumento del numero di campioni nei grandi centri di riferimento diagnostico e alla necessità di rivedere, ed eventualmente ampliare, la tipologia di offerta dei profili analitici.

La necessità di semplificare l'organizzazione del lavoro ha reso necessario il potenziamento di alcune linee analitiche pre-esistenti che avevano garantito la migliore affidabilità diagnostica, accorpando su di esse il maggior numero di analiti, ed eliminandone altre.

Metodi. Fase pre-analitica: TECAN Genesis FE500™ per un totale di 400 provette/giorno.

Linea analitica ABBOTT: tre ARCHITECTi2000® per un totale di 250 provette/giorno e 11 diversi parametri.

Linea analitica DADE-BEHRING: due diluitori TECAN (Genesis RSP100 e Genesis RSP200) e quattro BEPIII®, per un totale di 150 provette/giorno e 38 diversi parametri

Risultati. Sulla linea analitica ABBOTT vengono effettuate in giornata, su provetta madre, le analisi di screening per Epatite, HIV e Sifilide.

Sulla linea analitica DADE-BEHRING vengono effettuate le analisi del gruppo TORCH e le varie sierologie per gli antigeni respiratori, *Borrelia burgdorferi*, Morbillo, Parotite, *Helicobacter pylori*.

Conclusioni. L'impiego di due sole linee analitiche ha permesso di far fronte sia al notevole aumento del carico di lavoro sia alla riduzione del personale e degli spazi disponibili e ha reso più semplici le fasi di addestramento e turnazione del personale tecnico.

E' stata quindi raggiunta una ottimizzazione e semplificazione del flusso di lavoro con riduzione dei tempi di risposta e mantenimento della qualità dei risultati.

185

REGIONE CAMPANIA - MICOBATTERIOSI E DISTRIBUZIONE DI RESISTENZE DI MTC NEL 2006

Santoro G., Falca M., Russo F., Mallardo L., Smeraglia R.

UOC Microbiologia e Virologia
Direttore Prof. Riccardo Smeraglia
A.O.R.N. V. Monaldi Napoli

Introduzione. Nel 2006 abbiamo diagnosticato 68 nuovi casi di micobatteriosi. Di questi 55 sono stati classificati come tubercolosi sostenuta dal Complesso Tubercolare (MTC) e 13 come micobatteriosi sostenute da MOTT. Tra i MOTT abbiamo diagnosticato 5 casi di *M.kansasii* ed 8 casi dovuti al Complesso Avium (MAC); di questi ultimi 7 sono stati tipizzati come *M.intracellulare* ed 1 come *M.avium*.

Abbiamo indagato l'area geografica di provenienza dei pazienti, venuti alla nostra osservazione, con particolare attenzione alla distribuzione geografica delle resistenze dei ceppi MTC diagnosticati.

Metodi. Abbiamo allestito esame batterioscopico per BAAR (col. Ziehl-Neelsen DELCON), esame culturale in Lowenstein-Jensen BD ed in Middlebrook 7H9 (sistema MGIT 960 BD). La PCR per MTC è stata allestita con il sistema Cobas Amplicor della Roche.

Le colture positive sono state identificate con sonde Accuprobe Biomerieux.

I ceppi tipizzati come *M. tuberculosis complex* sono stati sottoposti a test di sensibilità in medium liquido (BACTEC MGIT 960 SIRE). Il laboratorio partecipa ai Controlli di Qualità dello Studio Multicentrico Italiano sulle Resistenze ai Farmaci Antitubercolari (Progetto SMIRA) per l'antibiotico-sensibilità, con ceppi dell'ISS, ed ai Controlli di Qualità dell'UK NEQAS per i Micobatteri.

Risultati. I 55 pazienti, con tubercolosi attiva da MTC, hanno la seguente distribuzione geografica:

ITA	AFR	NE EU	ASIA	S AM
27	13	12	2	1

I 13 pazienti diagnosticati come MOTT sono tutti di nazionalità italiana.

Per i ceppi MTC isolati, abbiamo saggiato Streptomina (SM), Isoniazide (INH), Rifampicina (RMP), Etambutolo (EMB) e Pirazinamide (PYR)

riscontrando le seguenti resistenze:

SM+ INH	SM	SM+ INH+ PYR	INH+ RMN	PYR
1 ITA	1 ITA 1 AFR	1 NE EUR	1 AFR	1 ITA

Discussione. L'emergenza di ceppi micobatterici farmaco-resistenti, molto diffusi in alcune aree del mondo, causa gravi ripercussioni nella scelta della terapia e nel controllo dell'infezione.

Per quanto il numero di ceppi esaminati non sia elevato, ci preme sottolineare come le resistenze più significative siano quelle espresse geograficamente dal NE EU e dall'AFR. I dati da noi riscontrati confermano quelli descritti dal Progetto WHO/IUATLD sulla sorveglianza dei ceppi multi-farmaco-resistenti.