
P116

STUDIO DI UN METODO RAPIDO MEDIANTE RIDUZIONE DI XTT PER LA DETERMINAZIONE DELLA RESISTENZA IN *M. TUBERCULOSIS*

Saddi M.^a, Sanna C.^a, Borgna R.^a, Sanna A.^a, Saddi B.^c, De Logu A.^a

^aSezione di Microbiologia Medica, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Cagliari,
Viale Sant'Ignazio 38, 09123 Cagliari
^cLaboratorio di Analisi Ospedale SS. Trinità, Cagliari

Fino a qualche anno fa la tubercolosi era ormai considerata una malattia a basso rischio epidemiologico. Attualmente, a causa della rapida insorgenza di mutanti farmaco-resistenti di *Mycobacterium tuberculosis*, questa malattia desta preoccupazione. I metodi attualmente disponibili per la determinazione della farmaco-resistenza presentano alcuni svantaggi. Il metodo proporzionale, approvato dal NCCLS, è un saggio semplice e poco costoso. Tuttavia, la sensibilità può essere determinata solo dopo 3 settimane di incubazione. Il metodo radiometrico che prevede l'utilizzo del Bactec, produce risultati entro 5-10 giorni, ma comporta rischi aggiuntivi quali la manipolazione di radioisotopi. L'uso di altre tecniche come l'identificazione dei geni che conferiscono resistenza nei confronti di farmaci antitubercolari, non è sempre possibile in quanto richiede personale specializzato. Abbiamo analizzato l'utilità di un metodo colorimetrico basato sulla riduzione del sale di tetrazolio XTT [2,3-bis (2-metossi-4-nitro-5-sulfonil)-5-(fenilamino)carbonil-2H tetrazolio] per testare la sensibilità di isolati clinici di *M. tuberculosis* all'isoniazide, rifampicina e streptomina. Con l'impiego di XTT la sensibilità alla rifampicina viene determinata dopo 3 giorni di incubazione, mentre sono richiesti 6 e 8 giorni per la determinazione della sensibilità rispettivamente a streptomina e isoniazide. Inoltre rispetto ad altri metodi colorimetrici, quali per esempio quello basato sull'impiego di MTT, la cui determinazione prevede la lisi cellulare, la riduzione di XTT porta alla formazione di un prodotto solubile per la cui determinazione quantitativa non sono necessari ulteriori trattamenti con solventi chimici e consente la determinazione della sensibilità e resistenza alla maggior parte dei farmaci antitubercolari. I risultati ottenuti confermano la validità del metodo colorimetrico per la determinazione rapida della antibiotico-resistenza negli isolati clinici di *M. tuberculosis*. Inoltre, presenta significativi vantaggi rispetto alle altre tecniche disponibili sotto il profilo economico e la sua semplicità di esecuzione ne consente l'impiego anche in Paesi in via di sviluppo nei quali è localizzato il maggior numero di persone affette da tubercolosi.

P117

CONSIDERAZIONI SULL'USO DELLA PCR NELLA DIAGNOSTICA TUBERCOLARE DI MATERIALI NON RESPIRATORI

Santoro G., Falca M., Sabatino R., Cione P.

UOC Microbiologia - Dipartimento di Medicina di Laboratorio ed Anatomia Patologica
A.O. Monaldi Via L.Bianchi Napoli

Obiettivi Scopo del lavoro è stato valutare l'opportunità di

effettuare la ricerca di *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC), utilizzando la tecnica di amplificazione genica in PCR, anche per i materiali di provenienza non respiratoria, pur se essa è validata esclusivamente per i materiali respiratori.

Nell'anno 2003, abbiamo analizzato, 161 campioni di provenienza non respiratoria (129 liquidi pleurici e 30 campioni di pus, biopsia o tessuto linfonodale, liquido pericardico e urine) per la diagnosi rapida di tubercolosi.

Metodologia Tutti i campioni non respiratori sono stati sottoposti ad esame batterioscopico diretto per la ricerca di bacilli alcol-acido resistenti, a valutazione diretta in PCR del *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) e ad esame culturale.

Un'aliquota del campione decontaminato è stata sottoposta ad amplificazione genica in PCR per la determinazione qualitativa di *M. Tuberculosis complex* con il sistema Cobas Amplicor della Roche che prevede l'uso di una strumentazione automatica per l'amplificazione e la rivelazione. In quest'ultimo caso, qualora non saggiati nelle 24h, i campioni sono stati congelati a -80°C. In tale metodica è sempre stato utilizzato un controllo interno intralaboratorio oltre ai controlli positivo e negativo proposti dalla ditta produttrice; i campioni che, alla prima determinazione, hanno mostrato la presenza di inibitori, sono stati diluiti 1:2 o 1:5.

Le colture positive sono state identificate con sonde costituite da DNA a catena singola complementare di una sequenza nucleotidica del genoma batterico che è specie-specifica (rRNA) ed è coniugata ad un marcatore chemiluminescente (Accuprobe Biomerieux).

Risultati: Correlando la positività del test di amplificazione alla positività culturale per MTC abbiamo osservato che dei 14 campioni risultati positivi all'amplificazione genica solo 9 trovavano conferma della positività nell'esame batterioscopico diretto o nell'esame culturale mentre 5 si associavano ad esame batterioscopico diretto ed esame culturale negativo. Di contro, abbiamo osservato solo 4 campioni che associavano amplificazione genica negativa ed esame culturale positivo per MTC.

Conclusioni I risultati su esposti, in una valutazione costi/beneficio, ci inducono a proseguire in tale direzione; infatti nel 50% dei casi esaminati è stato possibile fare diagnosi di tubercolosi nell'arco delle 24-48h. Ci pare altresì opportuno ripetere queste valutazioni alla luce di un maggior numero di campioni e nell'ambito di campioni omogenei.

P118

VALUTAZIONE DEL SISTEMA BD PROBETEC ET PER LA DIAGNOSI RAPIDA DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX

Zara F.¹, Troupioti P.², Brerra R.¹, Migliavacca R.¹, Nucleo E.¹, Spalla M.¹, Cardillo A.³, Giacobone E.³, Asticcioli S.¹, Pagani L.¹, Romero E.¹

¹Dip. SMEC-Sez. Microbiologia, Università di Pavia¹

²Lab. An. Chim. Clin. e Microbiologia, AO "E. Morelli", Sondalo (SO)

³Serv. An. Microb. IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Obiettivi valutare l'utilità, la sensibilità e la specificità del sistema molecolare automatico BD ProbeTec ET (DTB) (Becton Dickinson) in parallelo con i metodi diagnostici tradizionali ed il sistema automatico Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson).

Metodologia 132 campioni respiratori, raccolti da pazienti ospedalizzati ed ambulatoriali presso l'Azienda Ospedaliera "E. Morelli" di Sondalo nel periodo Settembre-Novembre 2002 e selezionati in base al sospetto clinico di TBC, sono stati valutati mediante esame batterioscopico, coltura in Lowenstein-Jensen e MGIT 960, dopo decontaminazione

con NALC-NaOH, in parallelo con il test DTB secondo le istruzioni d'uso.

Le colture dei campioni risultati negativi al test DTB sono state sottoposte a LiPA Mycobacteria (Innogenetics) per l'identificazione dei MOTT.

Risultati Dei 132 (128 escreti) campioni respiratori, 93 (71 positivi allo striscio) sono risultati positivi per *M. tuberculosis* complex (MTC) all'esame colturale; 88/93 (95.7%) campioni erano DTB positivi. Il DTB ha identificato MTC in 67/68 (98.5%) campioni con striscio e coltura positiva e in 22/25 (88%) campioni con striscio negativo e coltura positiva. Dei 33 campioni con coltura negativa, 28 (84.8%) sono risultati DTB negativi. 6/132 campioni, risultati successivamente positivi per MOTT all'esame colturale, erano DTB negativi. Solo 1 dei 132 campioni con coltura MTC-positiva risultava inibito al test. La sensibilità del test DTB su campioni respiratori è stata del 95.7%, la specificità del 84.8%, la likelihood ratio (LR) positiva di 6.32, LR negativa di 0.05.

Conclusioni Il test DTB offre un approccio rapido ed attendibile per la ricerca diretta di MTC da campioni respiratori, in aggiunta all'esame colturale.

P119

INFEZIONE DA CLADOPHIALOPHORA CARRIONII IN MADAGASCAR : ESPERIENZA PRELIMINARE.

Bruno R.*; Sanlorenzo M.*; Lasagna C.*; Cucchi L.*; Caldera D.*; Crema F.*; Defilippi S.*; Grosjean P.**; Rajeamirimoelisoa C.**

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

° Equipe Sanitaria Ospedale "S. Croix" Isoanala (Madagascar)

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

Introduzione: *Cladophialophora carrionii* è responsabile di cromoblastomicosi ed è endemica in Madagascar, in particolare nel sud dell'isola.

Materiali e metodi: Da maggio a settembre 2003 presso l'ospedale St. Croix di Isoanala (sud Madagascar) 4 pazienti (tre uomini e una donna, età media 41,5 anni, range 31-54) con lesioni cutanee sospette per cromoblastomicosi sono stati sottoposti a:

- esame microscopico diretto di squame cutanee per ricercare i corpi sclerotici tipici della malattia
- prelievo biotico multiplo (tre frammenti) per esame istopatologico mirante alla definitiva diagnosi
- esame colturale con identificazione del micete responsabile dell'infezione.

L'esame microscopico diretto e la semina su Sabouraud + cloramfenicol + gentamicina sono eseguiti a Isoanala, i successivi accertamenti diagnostici sono effettuati presso l'Institut Pasteur de Madagascar a Antananarivo.

Risultati: In tutti i 4 casi sono stati evidenziati, nei prelievi biotici, i caratteristici corpi sclerotici; l'esame colturale ha dato esito dubbio in un caso, ma in 3 soggetti ha portato all'isolamento di *Cladophialophora carrionii*.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a terapia sistemica con terbinafina: 250 mg x2/die per due mesi e 250 mg/die per ulteriori sei mesi.

Durante il trattamento un monitoraggio mensile dei più significativi parametri ematochimici non ha evidenziato alterazioni, né si è verificata intolleranza farmacologica.

Nelle 3 forme verrucose-granuleggianti si è avuta una notevole regressione delle lesioni con completa guarigione clinica in 2 pazienti. Nella forma nodulare si è avuta una riduzione volumetrica delle lesioni senza guarigione completa,

per cui si è deciso di prolungare la terapia.

Conclusioni: La terbinafina ha dato ottimi risultati con nessun effetto collaterale; in mancanza di protocolli standard internazionali, occorre attentamente valutare la durata del trattamento in base all'estensione e alla forma clinica della malattia.

P120

"CASE REPORT" DI INFEZIONE DA NOCARDIA ASTEROIDES

Cava M.C.¹, Trequattrini T.², Cappiello G.¹, Magnanti M.¹, Malgrande A.¹, Fumagalli G.², Rivitti R.², Spanò A.¹

¹Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia -

²Struttura Complessa di Pneumologia Clinica

Ospedale "Sandro Pertini", ASL Roma B

La nocardiosi polmonare è un evento poco frequente, spesso non riconosciuto sia a livello clinico che microbiologico. Trattasi generalmente di una infezione opportunistica, ma può essere riscontrata anche in pazienti immunocompetenti. Dal giugno 2002 a dicembre 2003 nell'ambito della diagnostica di laboratorio delle micobatteriosi polmonari con il sistema fluorimetrico MGIT sono stati identificati Actinomiceti aerobi debolmente acido resistenti in 11 pazienti, pari a 1.8% dei soggetti esaminati. Solo in due pazienti, afferenti al Day-Hospital di Pneumologia, è stato possibile correlare il riscontro microbiologico alla sintomatologia clinica: un caso con patologia ostruttiva negativo radiologicamente ma con tosse ed escreato purulento persistente, l'altro caso con infiltrato polmonare sottoclavareo.

Gli escreti (almeno tre per paziente) inoculati, dopo opportuno procedimento di decontaminazione, in terreno liquido fluorimetrico MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) e processati dal sistema automatico BACTEC MGIT 960, sono risultati positivi per Actinomiceti aerobi debolmente acido resistenti (colorazione di Ziehl-Nielsen modificata). La subcoltura in terreno agarizzato al 5% di sangue di montone ha mostrato tipiche colonie stellate, tenacemente adese al terreno e dal caratteristico odore.

Tutti i campioni di escreato esaminati relativi ai due pazienti hanno confermato l'infezione ed in un caso l'esame batterioscopico ha evidenziato la presenza di batteri ramificati debolmente acido resistenti.

Dopo terapia antibiotica specifica le colture sono risultate negative e la sintomatologia clinica è regredita.

P121

RILEVAMENTO DI SNP NEL CODONE 464 DEL GENE ERG11 IN CANDIDA ALBICANS, MEDIANTE PYROSEQUENCING

^aOrrù G., ^aCiusa M.L., ^aPuscaddu G., ^aMontaldo C., ^bCasentino S., ^bPisano B., ^cMeroni E., ^aPiras V., ^bFadda M.E.

^aO.B.L. (Oral Biotechnology Laboratory) Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche Università degli Studi di Cagliari.

^bDipartimento di Biologia Sperimentale, Sezione di Igiene Università degli Studi di Cagliari.

^cBIOSENSE S.r.l. Cinisello Balsamo - MI

Gli antifungini azolici rappresentano un'importante classe di farmaci utilizzati nelle infezioni da *C. albicans*, mutazioni