

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

ENTEROCOCCHI 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 Speri. 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-Barrè, 2 HCMV/Guillain-Barrè, 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.