

008

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

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

Cattedra di Microbiologia, Università "Magna Graecia" di Catanzaro

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

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

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

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

009

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

010

INFEZIONE POST CHIRURGICA DA MYCOBACTERIUM XENOPI: CASO CLINICO

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

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

²U.O.C. Chirurgia Oncologica

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

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

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

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

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

011

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

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

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

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

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

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

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

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

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

012

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

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

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

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

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

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

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

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

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