

M066**EPISODIO DI CONTAMINAZIONE DI CAMPIONI NEL SISTEMA DI LETTURA BACTEC 460 E VERIFICA CON METODICA PFGE.**

Buratta M.; Moro A.; Iurlo A.; Cassetti T.; Pasquale L.; Sposini T.; Mazzolla R.; Bistoni F.

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Sc. Biochimiche, Sez. Microbiologia, Università degli Studi di Perugia, Via del Giochetto, 06122 Perugia

Obiettivo: abbiamo verificato, tramite elettroforesi pulsata, che l'isolamento di *M. tuberculosis* complex, da 5 campioni di pazienti diversi, era dovuto a contaminazione verificatasi nel Bactec 460 (BD).

Materiali e Metodi: i campioni, provenienti da pazienti ricoverati in varie Cliniche dell'Azienda Ospedaliera di Perugia, sono pervenuti nel nostro Laboratorio di Micobatteriologia ed hanno subito il normale iter diagnostico di sbatterizzazione e semina. Sono stati seminati in terreno solido Lowenstein Jensen e in terreno liquido 7H12 Middlebrook (12 B) del sistema radiometrico Bactec 460 (BD). Dalle colture sviluppatesi è stata eseguita la tipizzazione con il test AccuProbe (GenProbe). Tali colonie sono state inserite in piccoli gel di agarosio, sottoposti a trattamenti litici con distruzione della parete cellulare e liberazione di DNA cromosomico. Il DNA è stato digerito con l'enzima di restrizione XbaI e sottoposto ad elettroforesi in campo pulsato (PFGE).

Risultati: la colorazione Ziehl Neelsen allestita sui campioni era positiva solo per il paziente n° 1 e negativa per gli altri 4. Dai 5 campioni seminati in 12B sono stati isolati 5 *M. tuberculosis* complex. L'osservazione delle semine dirette dei campioni in terreno solido Lowenstein Jensen ha mostrato crescita solo nel campione n° 1. Notizie cliniche riferivano malattia tubercolare solo nel paziente n°1.

Il risultato dell'elettroforesi in campo pulsato ha mostrato profili genomici identici in tutti e 5 i campioni.

Conclusioni: la contaminazione del terreno liquido dei 4 campioni negativi si è verificata a causa di un cattivo funzionamento del sistema di sterilizzazione degli aghi per la lettura dei flaconi 12B del Bactec 460. L'elettroforesi pulsata ha messo in evidenza che i profili genomici dei 5 micobatteri erano identici e quindi derivanti da un unico microorganismo. Le notizie cliniche hanno confermato l'avvenuta contaminazione dimostrando l'importanza della valutazione critica da parte dell'operatore dei dati di laboratorio correlati ai dati clinici.

M067**VERIFICA DI VITALITÀ DEI BACILLI TUBERCOLARI IN PREPARATI MICROSCOPICI PER LA COLORAZIONE DI ZIEHL NEELSEN.**

Moro A.; Buratta M.; Iurlo A.; Cassetti T.; Pasquale L.; Sposini T.; Mazzolla R.; Bistoni F.

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Sc. Biochimiche, Sez. Microbiologia, Università degli Studi di Perugia, Via del Giochetto, 06122 Perugia

Obiettivo: la preparazione di vetrini da campioni per la colorazione Ziehl Neelsen, rappresenta una potenziale fonte di infezione poiché i bacilli sopravvivono se non opportunamente

trattati prima della colorazione. Abbiamo valutato la vitalità dei bacilli dopo vari trattamenti di inattivazione.

Materiali e Metodi: a 10 ml di espettorato autoclavato è stato aggiunta una sospensione di *M. tuberculosis* H37Ra, ATCC 25177, per raggiungere le concentrazioni di 0,5 McF, 1 McF e 2 McF. I vetrini, sterilizzati, sono stati preparati con le sospensioni batteriche e lasciati asciugare sotto cappa. I trattamenti di inattivazione utilizzati sono stati: calore (80°C); esposizione ai raggi ultravioletti e fenolo al 5%. I tempi di esposizione per il calore, gli UV ed il fenolo al 5% sono stati: 30 min., 1 h, 2h e 24h. I vetrini sono stati incubati a 37°C per 10 giorni in tubi Falcon contenenti 20 ml di 7H9 Middlebrook. Terminata l'incubazione, dai brodi centrifugati, i sedimenti sono stati seminati in MGIT 9600 ed incubati 8 settimane.

Risultati: Dopo 2 h in stufa a 80°C tutte e tre le sospensioni di micobatteri risultavano non vitali. Gli UV sono in grado di inattivarle solo dopo 24 h di esposizione. Al contrario, il fenolo al 5%, dopo un contatto con la sospensione batterica per 30 minuti è in grado di uccidere tutti i bacilli presenti.

Conclusioni: l'esposizione al calore ad 80°C per 2h ed il contatto per 30 minuti con il fenolo al 5% rappresentano il tempo minimo necessario per inattivare i bacilli tubercolari, alternativamente una buona efficacia è dimostrata dal trattamento con i raggi UV dopo 24h di esposizione. La tempestività della risposta microscopica consente al clinico una più rapida diagnosi e terapia antibiotica adeguata. Questo studio ci consente di associare la rapidità dell'esame diretto con una buona sicurezza di laboratorio.

M068**RICERCA DIRETTA DI M. TUBERCULOSIS IN CAMPIONI RESPIRATORI CON IL SISTEMA AUTOMATICO BDPROBETEC ET.**

Di Taranto A., De Nittis R.,* Mosca A., *Barra Parisi G., Antonetti R.,* Miragliotta G.

Laboratorio di Microbiologia, Ospedali Riuniti di Foggia, *Cattedra di Microbiologia, Dip. MIDIM, Università di Bari

BDProbeTec ET (Becton Dickinson) è un sistema automatico che permette la ricerca rapida di *M. tuberculosis* direttamente nel campione clinico. Questo sistema utilizza come amplificazione isoterma del DNA la tecnologia SDA (Strand Displacement Amplification) e, come metodo di rilevamento, il trasferimento di energia fluorescente, consentendo l'amplificazione e la rivelazione del DNA in real-time.

Presso il laboratorio di Microbiologia degli Ospedali Riuniti di Foggia, per la ricerca diretta di *M. tuberculosis*, al tradizionale esame batterioscopico e culturale (Bactec 960 TB, Becton Dickinson) è stato affiancato il sistema SDA. Nell'anno 2002 sono stati esaminati 712 campioni respiratori tutti provenienti da pazienti ospedalizzati ed ambulatoriali sui quali di routine viene eseguita la ricerca di *M. tuberculosis*. In particolare, sono stati processati 76 espettorati, 596 BAL e broncoaspirati, 40 liquidi pleurici.

16/21 (76.2%) campioni positivi all'esame culturale sono risultati positivi col test SDA. In particolare, all'esame batterioscopico 12/21 sono risultati positivi e 4/21 negativi. 5/21 (23.8%) campioni positivi all'esame culturale sono risultati negativi al batterioscopico e al test SDA. Infine, 5 campioni negativi all'esame batterioscopico e culturale sono risultati positivi al test SDA (4 da pazienti in terapia antitubercolare). I nostri risultati suggeriscono che la real-time PCR, metodica di semplice esecuzione, è attendibile per la rilevazione diretta di *M. tuberculosis* da campione clinico e può essere