

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

considerata una valida e più rapida alternativa ai metodi tradizionali.

M069

BD PROBETEC ET MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX (DTB): CONSIDERAZIONI DOPO 15 MESI D'USO

Caola I., Sartori R., Amari A., Fedrizzi M., Filippi S., Pederzoli L., Rigoni A., Caciagli P.

Laboratorio di Microbiologia, Ospedale di Trento

Scopo: Effettuare una valutazione comparativa tra i metodi diagnostici tradizionali e il metodo rapido di amplificazione genomica DTB, in riferimento alla conferma clinica di TBC.

Materiali e metodi: 680 campioni selezionati da 3960 pervenuti al laboratorio in 15 mesi, sono stati sottoposti a ricerca di *M.t.* in biologia molecolare in base alla specifica richiesta del clinico, alla motivazione del sospetto clinico, alla presenza nello striscio di batteri alcool-acido resistenti.

I 680 campioni sono stati sottoposti a microscopia dopo colorazione di ZN, coltura in terreno solido LJ ed in MGIT dopo fluidificazione e decontaminazione con NALC-NaOH e amplificazione genomica con sistema BD Probetec ET (DTB). Esso utilizza una tecnica di Strand Displacement Amplification per l'identificazione qualitativa diretta da campioni clinici del DNA del complesso *Mycobacterium tuberculosis (M.t.)*. Il test DTB è stato eseguito ed interpretato secondo le istruzioni del produttore.

466 campioni provenivano dalle vie respiratorie (243 escreti, 37 BAL, 186 broncoaspirati), 214 erano campioni extrapolmonari (65 urine, 88 liquidi da siti sterili, 61 pus e biopsie).

Risultati: Dei 466 campioni respiratori 22 erano positivi al test DTB. Di questi 14 presentavano striscio e coltura positivi, 7 striscio negativo e coltura positiva, 1 striscio e coltura negativi. 3 campioni sono risultati DTB negativi con striscio negativo e coltura positiva. La diagnosi di TBC è stata confermata clinicamente per un totale di 25 casi.

Sono stati isolati anche 7 *MOTT* (2 *MAC*, 2 *M.gordoniae*, 2 *M.chelonae*, 1 *M.fortuitum*) per i quali il test è risultato sempre negativo. La sensibilità del test su campioni respiratori è stata del 88%, la specificità del 100%.

Sui 214 campioni extrapolmonari 21 erano positivi al test DTB. Di questi 9 presentavano striscio e coltura positivi, 7 striscio negativo e coltura positiva, 2 striscio e coltura negativi. 3 pazienti in terapia antitubercolare, iniziata prima degli accertamenti di laboratorio, avevano striscio positivo, coltura negativa e DTB positivo. Le infezioni tubercolari extrapolmonari confermate clinicamente erano in totale 23, di cui 2 con DTB negativo (1 con striscio e coltura positiva, 1 positivo solo alla coltura). I due campioni risultati DTB negativi con coltura positiva per *M.t.* erano entrambi liquidi pleurici che non hanno rivelato presenza di inibitori della reazione di amplificazione. Nei quattro casi di isolamento di *MOTT* (1 *BCG*, 2 *MAC*, 1 *M.marinum*) il test DTB è sempre risultato negativo. La sensibilità del test su campioni non respiratori è stata del 92%, la specificità del 100%.

Conclusioni: Il sistema diagnostico DTB, utilizzato per rendere più rapida la diagnosi di TBC, ha mostrato buone performance in termini di sensibilità e specificità, assieme alla semplicità e sicurezza di esecuzione. L'introduzione di tale metodologia ha permesso al laboratorio di fornire un effettivo contributo al clinico per l'inquadramento diagnostico di una patologia antica che si presenta oggi talvolta con caratteristiche atipiche.

M070

BRONCOPNEUMOPATIE CRONICO OSTRUTTIVE IN PAZIENTI ANZIANI: EPIDEMIOLOGIA E CHEMIOANTIBIOTICO SENSIBILITA'.

Frugoni S.¹, Spuria N.¹, Barigozzi P.¹, Bollini B.¹, Dalla Valentina P.¹, Carotenuto E.², Bezzi ML.², Faccone G.², Garbagnati C.², Berardinelli P.², Berlusconi A.¹

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche;

²U.O.S. Fisiopatologia e Riabilitazione Respiratoria; Ist. Geriatrico "Pio Albergo Trivulzio", Via Trivulzio 15, 20146 Milano.

La più frequente patologia respiratoria nei soggetti anziani è la broncopneumopatia cronico ostruttiva (BPCO), di cui le (sovra)infezioni batteriche sono la più nota causa di esacerbazione a evoluzione peggiorativa.

Scopo del lavoro è valutare, nell'espettorato di anziani con BPCO, eventuale peculiarità di frequenza di isolamento di microrganismi patogeni e relativo spettro di sensibilità chemioantibiotica.

Nel periodo 01.05.2002 - 31.04.2003 sono stati esaminati 227 espettorati di pazienti ambo sesso, con età media 79 ± 6.51 anni. L'idoneità dei campioni era stabilita dai criteri di Watteau. Sono stati esclusi dall'analisi statistica i microrganismi duplicati o isolati 15 giorni dopo terapia antibiotica, considerati una nuova infezione.

Gli isolamenti sono stati eseguiti in terreni commerciali (bioMérieux), il conteggio delle UFC con tecnica di diluizione in soluzione fisiologica e semina in Agar Cioccolato; l'identificazione con strumentazione automatica Vitek (bioMérieux), antisieri specifici e/o prove biochimiche appropriate e specifiche.

La chemioantibiotico sensibilità è stata determinata con sistema Vitek o con metodo in agar diffusione utilizzando terreni culturali, temperature e atmosfere idonee. La capacità di produrre β-lattamasi è stata determinata con dischetti di Nitrocefina (Cefinase - Becton Dickinson).

La chemiosensibilità dei microrganismi era rivolta ad antibiotici usuali nelle patologie respiratorie. Sono risultati positivi 95 campioni pari al 41,8%. In tutti i campioni positivi è stata isolata flora batterica monomicrobica in carica superiore a 10⁷UFC/mL.

I microrganismi più frequentemente isolati sono risultati essere: *P.aeruginosa* (45%), *B.catarrhalis* β-lattamasi produttore (13%), *H.influenzae* (12%), *E.aerogenes* (6%), *S.pneumoniae* (4%), *P.mirabilis* (5%), *S.aureus* (2%); altri (13%).

P.aeruginosa ha mostrato una sensibilità elevata, nell'ordine, ad Amicacina, Tobramicina, Imipenem; *H.influenzae* a Cefuroxime; *S.pneumoniae* alle ampicilline; *S.aureus* a Vancomicina e Teicoplanina.

I dati sono congruenti con la letteratura ma la frequenza di *P.aeruginosa* e la sensibilità a farmaci nefrotossici giustifica la sempre maggior gravità clinica delle riacutizzazioni bronchitiche di BPCO in anziani di età avanzata; conforta le scelte aziendali per una cura globale di tali soggetti in ambienti ad elevata aggregazione funzionale specialistica.