

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-oftalmiti, 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.