

150

IMPIEGO DI METODI MOLECOLARI (16S-RNA) PER L'IDENTIFICAZIONE DI AGENTI INFETTIVI RESPONSABILI DI INFEZIONI CATETERE-CORRELATE IN PAZIENTI EMODIALIZZATI

Cazzavillan S*, Verbine A°, D'Amore E.G.S*, Furlan F^., Grillone R^., Zoppelletto M.^, Ronco C.°, Rassa M.^

*U.O. Anatomia Patologica, ° Dipartimento di Nefrologia, ^U.O. Microbiologia e Virologia, Ospedale S. Bortolo, Vicenza

Riportiamo un metodo semplice e universale sviluppato per la ricerca ed identificazione di microrganismi a lenta crescita o inusuali che possono causare infezioni catetere-correlate. L'applicazione di questo protocollo ha permesso di identificare *Methylobacterium spp*, non identificabile con i metodi convenzionali. È stata utilizzata una estrazione del DNA con metodo Qiagen, impiegabile sia per i batteri che per i funghi; il DNA estratto da una coltura di bacilli G-, a lenta crescita (7 giorni), coltivabile su terreno Sabouraud con crescita ottimale tra 25-30°C senza sviluppo a 37°C con colonie mucose di colore rosa, identificato biochimicamente come *Rhodotorula*, è stato amplificato con 2 coppie di primers universali. I primers utilizzati per i funghi sono stati ITS1 e ITS4 (circa 500 bp) che riconoscono una regione dell'rRNA fungino, mentre per i batteri sono stati utilizzati 355F e 910R che amplificano una regione di 540 bp del gene 16SrRNA. L'amplificazione con ITS1-ITS4 è risultata negativa, mentre è stato amplificato il DNA batterico. Dopo elettroforesi e purificazione dal gel, i prodotti di PCR sono stati sequenziati; i risultati sono stati confrontati con le sequenze pubblicate sulla banca dati BLAST e l'agente è stato identificato come *Methylobacterium spp*, batterio ambientale isolato da acqua potabile clorinata e da liquidi di dialisi.

Il largo impiego di cateteri in pazienti dializzati aumenta il rischio di colonizzazione e/o infezioni da microrganismi che possono produrre biofilm. Molte specie di micobatteri, actinomiceti, microrganismi a lenta crescita e lieviti presentano caratteristiche biochimiche e morfologiche che non consentono una buona identificazione con i metodi biochimici disponibili in commercio. Dal momento che tutti i microrganismi possiedono una copia del gene codificante per l'rRNA, che contiene sequenze conservate e variabili, questo consente di differenziare e di caratterizzare tassonomicamente l'agente infettivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferrer C, et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. J.Clin:Microbiol 2001; 39(8):2873-2879

151

IDENTIFICAZIONE RAPIDA CON PCR REAL TIME DI MRSA E VRE ISOLATI DA CAMPIONI CLINICI

Ricci L., Murru G., Varini R., Guidetti C., Vecchia L.

Laboratorio di Microbiologia A.O.S.M.Nuova, Reggio Emilia

Introduzione. Il gold standard per individuare la meticilino-resistenza è la ricerca del gene *mecA* che caratterizza la resistenza di *S. aureus* verso gli antibiotici β -lattamici incluse le cefalosporine e carbapenemi. La ricerca dei geni *VanA* e *VanB* caratterizza la resistenza acquisita da *Enterococcus spp* verso la vancomicina.

Scopo del lavoro è valutare l'accuratezza del test PCR real time nella ricerca dei geni che codificano per tali resistenze.

Metodi. Abbiamo utilizzato i test: LightCycler® MRSA e LightCycler® VRE per la ricerca rispettivamente del gene *mecA* e dei geni *VanA* e *VanB* da isolati batterici di *S.aureus* e di *Enterococcus spp.* provenienti da infezioni localizzate in varie sedi di pazienti ospedalieri. Contemporaneamente tutti gli stipiti sono stati sottoposti ai test tradizionali d'individuazione di resistenza verso l'oxacillina per gli MRSA (n=50) ed alla vancomicina per i VRE (n=14). Per valutare la specificità del metodo, sono stati analizzati anche 25 isolati di *S.aureus* coagulasi negativi e 25 di Enterococchi vancomicina-sensibili.

Risultati. L'applicazione del metodo PCR real-time ha consentito di ottenere un'identificazione dei ceppi MRSA e VRE in tempi molto rapidi, circa 3 ore, rispetto alle 24-48 ore impiegate per l'esecuzione dei test tradizionali. Confrontando i risultati ottenuti con entrambi i metodi abbiamo riscontrato una correlazione del 100%: infatti gli stipiti in cui è stata dimostrata la presenza dei geni *VanA* e *VanB* e *mecA* risultavano resistenti agli antibiotici testati in vitro (oxacillina, vancomicina). Viceversa i batteri oxacillina e vancomicina-sensibili non contenevano i geni suddetti.

Conclusioni. Il nostro studio ha dimostrato che il sistema LightCycler® è efficace per l'identificazione in tempi molto rapidi di MRSA e VRE. Ne consegue un referto tempestivo che facilita l'ottimizzazione della terapia e la messa in atto di tutti i meccanismi idonei al controllo delle infezioni e prevenzione di diffusione di questi patogeni.