

comunicazioni orali

SESSIONE 5

La diagnostica molecolare in batteriologia: attualità e prospettive

Mercoledì 20 Settembre 2006, ore 09.00-13.00, Sala GIALLA

CO5.1

DIAGNOSI RAPIDA DI SEPSI: RISULTATI DELLA VALUTAZIONE DEL TEST LIGHTCYCLER® SEPTIFAST

Raglio A.¹, Rizzi M.², Amer M.³, Mangia M.⁴, Lucà MG.⁵, Fiorina L.¹, Goglio A.¹

¹Microbiologia e Virologia, ²Malattie Infettive, ³Terapia Intensiva, ⁴Medicina Interna, ⁵Gastroenterologia, AO Ospedali Riuniti, Bergamo

Introduzione.

È oggi disponibile un metodo in Real-Time PCR (LightCycler SeptiFast, Roche Diagnostics) che consente l'identificazione dei 25 principali microrganismi responsabili di sepsi (gram+, gram- e funghi). Il nostro laboratorio ha partecipato a diversi studi multicentrici europei tra i quali lo studio beta i cui risultati globali hanno portato alla marcatura CE del test. Riportiamo i nostri risultati.

Metodi.

I campioni per il test in PCR (LightCycler® SeptiFast) sono stati raccolti contemporaneamente ai campioni prelevati per l'esame emoculturale (BC) in pazienti con SIRS. Per ogni paziente sono stati raccolti i dati clinici e di laboratorio ed i risultati microbiologici di altri campioni.

BC è stato eseguito con il sistema BactAlert (BioMerieux). LightCycler® SeptiFast è stato eseguito sullo strumento LightCycler 2.0 CE-IVD (Roche Diagnostics) previa estrazione dell'acido nucleico a partire da 3 mL di sangue K-EDTA. Il test ha una durata di 6 ore, a partire dal campione di sangue. I risultati sono stati valutati insieme ai clinici sulla base dei dati clinici, microbiologici (su campioni diversi da sangue) e di laboratorio.

Risultati.

Sono stati esaminati 214 campioni raccolti da 101 pazienti. 162 campioni sono risultati negativi in BC e in SeptiFast. Il tasso di positività per BC è stato del

9.8% e per la SeptiFast del 21.5%:

Dei 21 risultati positivi in emocoltura il 71% concordevano con SeptiFast, il 14% erano contaminanti e il 14% erano positivi solo con BC clinicamente significativi (2 *S. pneumoniae* e 1 *C. albicans*).

Dei 46 risultati positivi con LightCycler SeptiFast il 74% sono stati confermati con altri test (32% con BC, 41% con altri test microbiologici). In particolare SeptiFast ha permesso la diagnosi eziologica in 6 pazienti: polmonite da *S. pneumoniae*, peritonite da CoNS, epatocolangite da *E. coli* e da *K. pneumoniae/oxytoca*, polmonite da *P. aeruginosa*, batteriemia catetere correlata da CoNS, polmonite da *A. fumigatus*. Per il 26% dei risultati positivi non è stato possibile nell'ambito dello studio arrivare a definire un ruolo eziologico.

Conclusioni.

I nostri dati confermano la rapidità (identificazione dei patogeni in 16 - 40 ore in relazione all'organizzazione di laboratorio) e la maggior sensibilità di SeptiFast rispetto a BC (con un tasso di positività doppio) rispetto a BC. I risultati, come per l'emocoltura, devono sempre essere letti criticamente tenendo conto di tutti i dati del paziente e dell'epidemiologia batterica dei reparti.

CO5.2

TIPIZZAZIONE DI CEPPI DI LEGIONELLA CLINICI ED AMBIENTALI CON TECNICHE MOLECOLARI (PFGE, RAPD E SBT)

Franzin L.

Laboratorio "Ricerca Speciale Microbiologica", Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, Ospedale Amedeo di Savoia, Corso Svizzera 164, 10149 Torino.

Introduzione.

La trasmissione dell'infezione da *Legionella* avviene

in genere mediante inalazione di aerosol contaminato. Trattandosi di batterio acquatico ubiquitario con serbatoio ambientale, la tipizzazione molecolare dei ceppi di *Legionella* isolati dal paziente e dall'ambiente è fondamentale in quanto permette di stabilire la relazione di clonalità dei ceppi epidemiologicamente correlati e di riconoscere la sorgente di infezione. In questo lavoro viene presentata l'utilità delle tecniche molecolari nello studio di 7 episodi di legionellosi.

Metodi.

I ceppi clinici ed ambientali sono stati isolati con procedure adottate nel nostro Laboratorio dal 1983, mediante l'uso combinato di vari terreni (BCYE, BMPA e MWY) e di diversi trattamenti (acidi, calore). I ceppi sono stati tipizzati con metodi sierologici; gli isolati di *L. pneumophila* sierogruppo 1 sono stati anche tipizzati con anticorpi monoclonali (MAb). I ceppi clinici e ambientali correlati isolati in 5 episodi di infezione nosocomiale e in 2 comunitari sono stati esaminati con PFGE (pulsed field gel electrophoresis), con RAPD-PCR (random primers amplified polymorphic DNA), con sequenziamento del gene *mip* o con SBT (sequence-based typing) secondo il metodo EWGLI.

Risultati.

In tutti i casi esaminati i ceppi isolati dal paziente e quelli ambientali correlati presentavano lo stesso profilo con le tecniche molecolari, mentre risultavano differenti rispetto a quelli non correlati. Le tecniche utilizzate, pur con diverso grado di potere discriminante e di sensibilità, sono risultate utili allo scopo. La combinazione con la tipizzazione con MAb ha fornito risultati ottimali.

Conclusione.

La tipizzazione genomica dei ceppi ha consentito di riconoscere in maniera inequivocabile la sorgente di infezione nei 7 episodi studiati. Si ribadisce ancora l'importanza della ricerca colturale dai campioni clinici; la disponibilità dei ceppi clinici ed ambientali consente infatti la loro tipizzazione con tecniche molecolari, che si sono mostrate di grande utilità ai fini epidemiologici per il riconoscimento della sorgente di infezione.

CO5.3

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI MICOBATTERI: "INNO-LIPA" E SEQUENZIAMENTO A CONFRONTO

Morelli S.; Pignatelli S.; Torsani E.*; Pignatelli S.*; Dal Monte P.; Sambri V.; Nanetti A.

DMCSS, sez. Microbiologia, Via Massarenti 9,
40138, Bologna,

*Specializzandi Scuola Spec. Microbiologia e Virologia,
UNIBO.

Introduzione.

L'elevato incremento delle infezioni da *M.tuberculosis*

complex e la comparsa di micobatteri non tubercolari *MOTT*, ha reso necessario introdurre nella routine diagnostica l'utilizzo di tecnologie molecolari, sia per ridurre i tempi di refertazione, che per giungere ad una identificazione inequivocabile.

Materiali e metodi.

A tale scopo è stato introdotto nel nostro laboratorio INNO-Lipa MYCOBACTERIA v-2 (ditta INNOGENETICS) che prevede l'amplificazione del DNA del micobatterio in corrispondenza della regione spaziatrice 16S-23S del gene che codifica per l'RNA ribosomiale (rRNA) e successiva ibridazione con sonde a sequenza specifica per l'identificazione del genere *Mycobacterium* e 16 diverse specie nell'ambito dello stesso genere.

Tuttavia, nel 16,5% dei casi non è stato possibile identificare la specie micobatterica.

A partire da gennaio 2005 abbiamo quindi estratto e conservato il DNA dei micobatteri da noi isolati. Su 50 micobatteri atipici isolati, in 8 casi non è stato possibile ottenere l'identificazione. Abbiamo pertanto valutato l'utilità di un saggio PCR "home-made" (Heekyung *et al*, J.Clin Microb., 2000; 38:4080-4085), mediante amplificazione della sequenza spaziatrice 16S-23S (ITS), successivo sequenziamento e confronto con le sequenze depositate in GenBank.

Risultati.

Nel corso dello studio abbiamo sequenziato 12 campioni precedentemente tipizzati (4 *Myc.tuberculosis* 2 *Myc.avium*; 1 *Myc.kansasii*; 1 *Myc.xenopi*; 1 *Myc.genevense*; 2 *Myc.chelonae*, 1 *Myc.gordonae*) e 8 campioni non identificati dal sistema INNO-Lipa. Delle 12 sequenze di micobatteri già noti, abbiamo ottenuto una concordanza del 100%. Tra gli 8 isolati non identificati, le sequenze sono state attribuite ai seguenti micobatteri: 1 *Myc.avium complex*, 2 *Myc.mucogenicum*; 3 *Myc.arupense*, 1 *Myc.gallinarum* e in un solo caso non è stato possibile assegnare la specie.

Conclusioni.

In definitiva quindi il sequenziamento può permettere un'identificazione sicura e accurata delle varie specie di micobatteri utile non solo ai fini epidemiologici, ma anche clinici. Inoltre non va sottovalutato che il sequenziamento è decisamente più economico rispetto al test INNO-Lipa.