

scie ad aumentare di circa 10 volte il rischio cardiovascolare rispetto alla popolazione normale. Studi recenti hanno dimostrato che piccoli frammenti di DNA batterico attraversano le membrane da emodialisi determinando infiammazione. Poichè i diversi biomateriali di cui sono composti i filtri da dialisi possono comportarsi in modo diverso nei confronti del DNA batterico (bdNA) abbiamo sviluppato un modello "in vitro" studiando il comportamento di 5 specifiche membrane biocompatibili da dialisi.

Metodi. In una apparecchiatura sperimentale per emodialisi, è stato fatto ricircolare sangue eparinato inoculato con *Paeruginosa* (150CFU/ml). Come controllo di infezione è stata effettuata una emocoltura dopo 5 e 60 min dall'inoculo. Al termine dell'esperienza il filtro è stato lavato con 2 L di fisiologica e gli ultimi 100 ml sono stati coltivati. Dal compartimento del sangue (BL) e del dialisato (DIA) è stato estratto separatamente il DNA, ed è stato ricercato il DNA codificante per 16SrRNA (bdNA) mediante PCR. L'amplificato è stato sequenziato per conferma.

Risultati. I risultati sono riportati in tabella. La presenza di bdNA è stata evidenziata in tutti i filtri mediante metodo molecolare, nonostante l'emocoltura degli ultimi 100 ml di fisiologica di lavaggio fosse negativa, e l'analisi di sequenza ha confermato i risultati. Nonostante l'inoculo nel sangue, il DNA di *Paeruginosa* è stato riscontrato anche nel DIA. I risultati sono paragonabili per tutti i filtri studiati.

Conclusioni. Dai dati ottenuti si può ipotizzare che i filtri agiscono da concentratori nei confronti del bdNA e che il bdNA può attraversare le membrane dei filtri. Dal momento che il bdNA è caratterizzato dalla presenza di strutture particolari che attivano il sistema immunitario umano con produzione di citochine proinfiammatorie, la sua presenza nel BL potrebbe spiegare l'infiammazione quando non attribuibile ad altre cause cliniche note.

Filtro da emodialisi	Emocoltura			100 ml fisiologica finale	bdNA	
	Pre	5 min	60 min		Comp. sangue	Comp. dialisato
Fx100	Neg	+	+	Neg	+	+
Polyflux 210H	Neg	+	+	Neg	+	+
Nephral ST500	Neg	+	+	Neg	+	+
Filtryzer BK2.1F	Neg	+	+	Neg	+	+
Sureflux 190E	Neg	+	+	Neg	+	+

188

QUATTRO ANNI DI ATTIVITÀ PER L'ANTIBIOTICO-SENSIBILITÀ DI MTC

Santoro G., Falca M., Polidoro L. Russo F.

UOC Microbiologia e Virologia
Direttore Prof. Riccardo Smeraglia
A.O. Monaldi Via L.Bianchi Napoli

Introduzione. Nel 2002 abbiamo introdotto nel nostro laboratorio accanto al test di sensibilità in medium solido, Lowenstein-Jensen antibiotato, allestito secondo il metodo delle proporzioni (MOP), il test di antibiotico-sensibilità in medium liquido su ceppi del complesso *Mycobacterium tuberculosis*. Il nostro scopo è stato quello di ridurre i tempi di esecuzione dell'antibiogramma da 28 a 4-13 giorni. Inoltre, nel 2004, con l'introduzione del test Inno-LiPA

Rif.TB abbiamo rilevato, in tempi ancor più contenuti, la resistenza a RMP con l'analisi del genotipo.

Metodi. Kit BACTEC MGIT 960 SIRE della Becton Dickinson. Test di sensibilità (MOP) su Lowenstein-Jensen antibiotato della DASIT. Sistema INNO-LiPA Rif. TB della INNOGENETICS per la rilevazione della resistenza genotipica a RMP.

Risultati. Nel 2002 abbiamo affiancato SIRE e MOP su tutti i campioni; nel successivo anno tale protocollo è stato riservato solo ai pazienti di primo accesso mentre il monitoraggio dei pazienti a controllo veniva effettuato solo con SIRE e, all'insorgenza, le nuove resistenze confermate anche con il MOP. Successivamente abbiamo introdotto il test di genotipizzazione sui ceppi fenotipicamente resistenti a RMN. In media, per ogni anno, abbiamo allestito circa 90 tests di antibiotico-sensibilità, relativi ad altrettanti pazienti. I risultati di tali tests ci hanno portato alle seguenti percentuali di resistenza, dedotte dai tests in medium liquido, per gli antibiotici in tabella:

	SM	INH	RMP	EMB	PZA
2002	17.7%	25.3 %	8.9 %	3.8 %	NT
2003	11.4 %	24.7 %	9.0 %	3.5 %	4.8 %
2004	31.2 %	26.3 %	17.2 %	6.5 %	9.0 %
2005	17.7 %	22.7 %	11.5 %	6.3%	9.5 %

Tali percentuali risultano sovrapponibili a quelle osservate con i tests in medium solido ad eccezione dell'EMB che esprime percentuali più basse mediamente di 2 punti.

Discussione. L'esperienza acquisita in questi anni nella diagnostica dell'antibiotico-sensibilità, ci consente di abbandonare definitivamente l'uso MOP e di introdurre il test di genotipizzazione direttamente su campioni positivi all'esame microscopico ed all'amplificazione genica per MTC. Ciò consentirà di rilevare la resistenza alla rifampicina e quindi, per la nota associazione con INH, di eventuale ceppo MDR con un anticipo valutabile in circa 4 settimane. Questa informazione per il clinico risulterà di enorme utilità ed a vantaggio del paziente che eviterà l'assunzione di farmaci inadeguati ed il prolungamento del tempo di degenza. Inoltre, in tal modo, è possibile attuare un più stretto controllo sulla diffusione di ceppi MDR ed un contenimento della spesa sanitaria relativa ai costi di una terapia inappropriata ed al prolungamento dei tempi di degenza.

189

UN CASO DI TUBERCOLOSI INTESTINALE SOSTENUTO DA MYCOBACTERIUM GORDONAE DIMOSTRATO MEDIANTE POLYMERASE CHAIN REACTION ED IBRIDAZIONE IN SITU INVERSA

Sarnelli B., Morelli M.L., Abate R., Matrone G., Ingala F.

Laboratorio di Patologia Clinica e Microbiologia
- P.O. "Ascalesi" - Via E. a Forcella 31 - Napoli

Caso Clinico. In una paziente di 46 anni, venuta alla nostra osservazione nel Marzo 2006, l'endoscopia diagnostica evidenziava la presenza di lesioni suggestive di IBD. Durante la colonscopia venivano eseguite biopsie multiple, sia per esame istologico, sia per la ricerca di Micobatteri.

Materiali e Metodi. I campioni biotici sono stati ridotti in aliquote da 25 mg circa. Una parte di queste è stata omogeneata in 2 ml di soluzione salina sterile 0.85% ed avviata all'esame culturale; almeno tre aliquote sono state conservate a

-25°C e processate entro 24h per l'estrazione del DNA con il metodo di estrazione di DNA da tessuti *High pure PCR Template Preparation Kit®* dalla Ditta ROCHE, che prevede digestione con *Proteinasi K®*, seguita da eluizione su colonne *High Pure Filter Tube®*. La PCR sugli eluati è stata eseguita utilizzando la DNA Polimerasi *AmpliTaq Gold®* della Ditta Applied Biosystem secondo il protocollo di amplificazione della regione spaziatrice 16S-23S del genere *Mycobacterium* indicato dal kit *INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 Amp®* della Ditta INNOGENETICS. I seguenti cicli termici sono stati eseguiti su termociclatore P.E. Cetus PE2400:

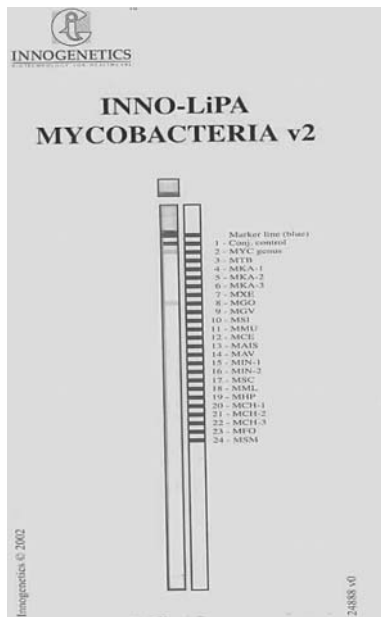
1. Denaturazione	95°C	1 min	} <u>40 volte</u>
2. Denaturazione	95°C	30 sec	
3. Appaiamento	62°C	30 sec	
4. Appaiamento	72°C	30 sec	
5. Hold	4°C	∞	

L'identificazione degli amplificati è stata effettuata con il metodo *INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2®* della Ditta INNOGENETICS, basato sul principio della ibridazione inversa: i prodotti dell'amplificazione sono stati biotinilati ed ibridati con sonde oligonucleotidiche immobilizzate su strisce di reazione, corrispondenti a 22 specie di *Mycobacterium*; altre 2 linee di controllo corrispondono rispettivamente al controllo di reazione del coniugato ed alla presenza del gene comune al genere *Mycobacterium*. L'ibridazione viene svelata dall'incubazione della striscia in presenza di streptoavidina legata a fosfatasi alcalina e successivamente dall'aggiunta del cromogeno.

Risultati. La presenza di DNA di *M. gordonae* nel campione è evidenziata dalla corrispondente linea di ibridazione inversa sulla striscia di reazione. (Fig.1)

Discussione. La ricerca tramite PCR di bacilli appartenenti al Genere *Mycobacterium* in campioni biotici intestinali, può contribuire a porre la diagnosi differenziale tra *M. di Crohn* e *Tubercolosi intestinale*. Nel caso in esame la coltura confermava dopo 21 giorni la presenza di *M. gordonae*. L'esperienza descritta suggerisce l'utilità di estendere la ricerca di Micobatteri anche a specie non comunemente coinvolte in processi intestinali, ricorrendo a metodi molecolari, altamente specifici e più sensibili rispetto ai metodi tradizionali.

Figura 1



190

GENOTIPI DI VIRUS C IN UN CAMPIONE DI PAZIENTI AFFERENTI ALLA U.O. SEMPLICE DI MICROBIOLOGIA, P.O. CASTROVILLARI

Venditti W., Bonifati A., Capano A., Di Vasto M., Maltese R., Vicchio T.

Unità Operativa di Microbiologia, P.O. Castrovillari (CS), Azienda Sanitaria N. 2

Introduzione. L'infezione da virus dell'epatite C rappresenta attualmente uno dei più importanti problemi di sanità pubblica a livello mondiale.

Il virus che causano l'epatite C costituiscono un gruppo che presenta sottotipi estremamente variabili. Lo studio del genotipo del virus HCV rappresenta un momento importante nella definizione epidemiologica e clinica dell'infezione. Il genotipo identifica la virulenza del ceppo infettante e consente di individuare categorie differenti di pazienti a cui applicare protocolli di trattamento antivirale differenziati. In Italia ed in Europa vi è una netta prevalenza del genotipo 1, ed in particolare del genotipo 1b.

Materiali e metodi. Nell'arco temporale 2003-2005 sono stati tipizzati i genotipi HCV di 211 pazienti, di cui 71 provenienti dal SERT e 140 ambulatoriali. L'RNA virale veniva estratto da campioni di siero la cui positività è stata rivelata mediante RT-PCR (Cobas Amplicor HCV, Roche) e genotipizzato mediante tecnica di ibridazione inversa su supporto solido (Versant HCV genotipo LiPA, Bayer).

Risultati. Il genotipo 1b è stato riscontrato nel 41% dei pazienti ambulatoriali e nel 6% dei pazienti provenienti dal SERT; il genotipo 1a rispettivamente nel 16 e 19% ; il 2a / 2c è stato riscontrato nel 5 e 43%; il 2a nel 10 e 1%; il 3a nel 26 e 25%; il 4 nel 2 e 7% .

Conclusioni. Il genotipo 1b è risultato essere, come ci si attendeva, il più frequente tra i pazienti ambulatoriali, i genotipi 2a e 4 i meno frequenti; nei pazienti afferenti al SERT è risultato essere più frequente il genotipo 2a/2c. In particolare lo studio del genotipo di HCV in questa ultima popolazione di pazienti, ad alto rischio di trasmissione del virus, rappresenta un utile marcatore di diffusione del virus, offrendo utili informazioni sulla modalità di selezione e circolazione dei genotipi virali.

191

HPV: CONDIZIONE NECESSARIA MA NON SUFFICIENTE NELL'EZIOLOGIA DEL CANCRO DELLA CERVICE

Venditti W.¹, Bonifati A.¹, Di Vasto M.¹, Stigliano C.M.³, Caruso W.², Fabrizio A.³, Schifino F.³

¹U.O. semplice Microbiologia

²U.O. Anatomia Patologica

³U.O. Ginecologia Preventiva, P.O. Castrovillari (CS),

Azienda Sanitaria N. 2

Introduzione. I papillomavirus sono virus a DNA a simmetria icosaedrica, mancanti di rivestimento pericapsidico. Dati biologici ed epidemiologici hanno portato a suddividere gli