

stici rivolti all'analisi genomica qualitativa e quantitativa. Scopo del nostro studio è stata la messa a punto di un sistema diagnostico che associa una tecnica di estrazione automatica di DNA ad un'amplificazione genica di tipo Real Time per l'analisi di campioni di liquido cerebrospinale.

Metodi. Sono stati analizzati 154 campioni di liquor prelevati da Febbraio 2005 a Febbraio 2006 da pazienti affetti da patologie acute e croniche del sistema nervoso afferenti al Policlinico "Umberto I" di Roma.

I campioni sono stati processati per l'estrazione degli acidi nucleici mediante un sistema automatico e il DNA ottenuto è stato sottoposto ad analisi mediante Real Time PCR di tipo Taq - Man per l'identificazione di HSV-1, HSV-2, EBV, HCMV, HHV6. Un sistema di PCR Nested è stato impiegato per l'identificazione di VZV.

Risultati. Dei campioni analizzati 118 (76.6%) sono risultati negativi ai virus erpetici testati e 36 (23.4%) positivi rispettivamente a: 11 VZV, 7 HSV-1, 4 HSV-2, 7 HHV6, 4 EBV, 1 EBV ed HSV-2, 1 VZV ed HHV6 e 1 HCMV ed EBV. Tempo di refertazione 3 ore dall'arrivo del campione clinico.

Conclusioni. Nel sistema da noi studiato l'automazione della fase di estrazione associata all'amplificazione di tipo Real Time ha permesso di ottenere risultati accurati con elevata rapidità di esecuzione ed aumento dell'efficienza diagnostica.

194

RILEVAZIONE MOLECOLARE DELLE RESISTENZE DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN CAMPIONI CLINICI

Zara F.¹, Meacci F.², D'Amato V.², Troupioti P.³, Sarassi A.³, Brerra R.¹, Pardini M.⁴, Orrù G.⁵, Ciusa M.L.⁵, Pagani L.¹, Orefici G.⁴, Fattorini L.⁴, Oggioni M.R.²

¹Sez. Microbiologia, Dip. SMEC, Università di Pavia, Via Brambilla 74, 27100 Pavia

²La.M.M.B., Dip. Biologia Molecolare, Università di Siena, Policlinico Le Scotte, Via Bracci, 53100 Siena

³AOVV Azienda Ospedaliera Valtellina e Valchiavenna Presidio di Sondalo, Via Zubiani 33, 23039 Sondalo,

⁴Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma,

⁵O.B.L., Università di Cagliari, Via Binaghi 4, 09121 Cagliari.

Introduzione. La selezione di mutanti di resistenza ad isoniazide e rifampicina è generalmente la causa di fallimenti terapeutici e del prolungato decorso clinico delle infezioni da *Mycobacterium tuberculosis*.

Pertanto sono necessari metodi molecolari utili ad una rapida rilevazione di tali mutazioni.

Metodi. 103 escreti, raccolti da 103 pazienti ospedalizzati ed ambulatoriali presso l'Azienda Ospedaliera di Sondalo nel periodo gennaio 2005 - gennaio 2006, sono stati decontaminati con NALC-NaOH e valutati mediante esame batterioscopico, coltura in Lowenstein-Jensen e MGIT 960. L'analisi molecolare è stata effettuata, dopo valutazione dell'idoneità del campione, con PCR qualitativa con target IS6110, real time PCR con sonde lineari FRET e tipizzazione con MIRU. L'antibiogramma per farmaci di seconda scelta è stata eseguito secondo protocolli standard.

Risultati. Con i metodi molecolari, la mutazione *katG315*

associata alla resistenza ad isoniazide è stata rilevata nel 15,4% dei campioni analizzati e nel 22,3% dei casi è stata evidenziata la mutazione *rpoB531* responsabile della rifampicina-resistenza. In 4 campioni la PCR real time sul gene *rpoB* ha evidenziato una popolazione mista (allele wild type e allele mutato).

I metodi molecolari e fenotipici hanno dato risultati sovrapponibili nel 97,4% dei casi per la resistenza ad isoniazide e nel 96% dei casi per la resistenza a rifampicina.

Conclusioni. L'analisi dei risultati ottenuti evidenzia una ottima concordanza tra i dati clinici, microbiologici e le caratterizzazioni molecolari, mostrando che l'approccio integrato colturale e molecolare può essere un utile strumento per la valutazione clinica e la gestione del paziente con tubercolosi.

195

INFEZIONE DA H. PYLORI: RUOLO DELLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE ED ESPERIENZA SULLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI

Basaglia G.¹, Cannizzaro R.², Sperandio P.¹, Stocco Calzavara S.¹, Pancino A.¹, Fornasari M.², Lacchin T.², De Paoli P.¹

¹UO di Microbiologia, Immunologia e Virologia

²UO di Gastroenterologia Oncologica

Centro di Riferimento Oncologico, Istituto Nazionale Tumori, IRCCS, Via Pedemontana Occ., 12, 33081 Aviano (Pordenone).

Introduzione. L'infezione da *Helicobacter pylori* è stata negli anni studiata sotto vari aspetti. E' ben nota la sua associazione con gastrite cronica, ulcera duodenale e gastrica, adenocarcinoma e MALT linfoma gastrici. Le indagini microbiologiche svolgono per questa infezione un ruolo importante sia dal punto di vista diagnostico che di ricerca (ruolo e indicazioni sono stati ripresi anche dal recente *Maastricht 3 Consensus Report*, 2005). Molti di questi aspetti sono stati da noi studiati e pubblicati. Nel controllo delle patologie associate riveste grande importanza la sensibilità di *H. pylori* agli antibiotici. Scopo del presente studio è di raccogliere tutti i dati sugli antibiogrammi eseguiti nel nostro Laboratorio per offrire un quadro epidemiologico in riferimento ai pazienti seguiti nel nostro Istituto.

Metodi. Sono stati studiati i ceppi isolati, nell'arco di 8 anni (1998-2006), da 123 pazienti afferenti all'UO di Gastroenterologia Oncologica del nostro Istituto sintomatici per patologia *H. pylori* associata o soggetti a rischio per lesioni neoplastiche. L'antibiogramma è stato eseguito con E-test per metronidazolo, claritromicina e amoxicillina e, negli ultimi 2 anni, per tetraciclina e levofloxacina.

Risultati. La percentuale delle resistenze per paziente è risultata: metronidazolo 59.8% (73/122), claritromicina 52.8% (65/123), amoxicillina 0% (0/122), tetraciclina 0% (0/51) e levofloxacina 24% (12/50).

Conclusioni. La nostra casistica rileva per metronidazolo e claritromicina percentuali elevate di resistenza, per levofloxacina tali percentuali sono più contenute e non sono rilevate invece per amoxicillina e tetraciclina. I dati trovano riscontro con quanto riportato in Letteratura. Per quanto riguarda in particolare le elevate percentuali relative a metronidazolo e claritromicina queste sono giustificabili tenendo

presente che molti dei pazienti studiati sono stati sottoposti a più linee di antibiotico-terapia capaci di selezionare i ceppi di *H. pylori* più resistenti. La disponibilità dell'antibiogramma per *H. pylori* è risultata utile per l'eradicazione di *H. pylori* resistenti al trattamento antibiotico di prima e seconda linea in pazienti sintomatici e in soggetti a rischio per lesioni neoplastiche. Inoltre il quadro epidemiologico riportato può essere utile a livello locale (ma arricchisce le nostre conoscenze anche per confronti più ampi) per una terapia empirica sempre più appropriata dell'infezione da *H. pylori*.

196

VALUTAZIONE DI UN TEST ELISA PER IL MONITORAGGIO TERAPEUTICO DI NELFINAVIR IN PAZIENTI HIV POSITIVI

Genco F., Meroni V., Uglietti A., Montagna M.¹, Regazzi Bonora M.¹, Maserati R.

Dipartimento di Clinica di Malattie Infettive, Università degli Studi Pavia.

¹ Dipartimento di Farmacologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Introduzione. Il monitoraggio terapeutico dei farmaci (TDM-Therapeutic Drug Monitoring) è diventato recentemente un importante strumento per ottimizzare la terapia antiretrovirale. La misurazione del TDM viene solitamente condotta con l'HPLC (High-Performance Liquid Chromatographic Assay) ormai ritenuta il golden standard.

Ma poiché la difficile esecuzione di questo test lo rende appannaggio di pochi centri specializzati negli ultimi due anni sono state introdotte nuove tecniche di misurazione della concentrazione plasmatica di farmaci (Nelfinavir, Lopinavir, Amprenavir etc.) come i test immunoenzimatici competitivi. Scopo dello studio è stato mettere a punto e valutare un test immunoenzimatico per il dosaggio di Nelfinavir prodotto dalla ditta BioStrands in comparazione con i dati ottenuti in HPLC.

Metodi. Campioni di plasma di pazienti HIV positivi in terapia con Nelfinavir sono stati prelevati allo stesso tempo a pazienti diversi e a tempi diversi allo stesso paziente per valutare le variazioni intra-paziente e inter-paziente del TDM. Sono stati analizzati 100 campioni e di questi la metà è stata esaminata anche con HPLC.

Risultati. L'andamento del TDM nel tempo risulta sovrapponibile a quello ottenuto con l'HPLC anche se diverso in valore assoluto.

Conclusioni. I nuovi tests immunoenzimatici non necessitano di una particolare strumentazione, risultano più semplici e rapidi da eseguire una volta acquisita la tecnica e danno risultati sovrapponibili alla curva delle concentrazioni plasmatiche dei farmaci misurate con l'HPLC.

197

ATTIVITÀ IN VITRO DI PRULIFLOXACINA VS. PAERUGINOSA: CONFRONTO CON CIPROFLOXACINA E LEVOFLOXACINA

Lanzafame P., Sartor A., Baron MT.

S.O.C. Microbiologia Azienda Ospedaliera S.Maria della Misericordia, Ple S.Maria della Misericordia 15, 33100 Udine

Introduzione. Prulifloxacin è una nuova molecola antibatterica della classe dei fluorochinoloni e rappresenta il profarmaco di Ulifloxacin, in cui è trasformata immediatamente dopo l'assorbimento ad opera di una esterasi: la paraossinasi. Il meccanismo di azione è dovuto alla inibizione delle topoisomerasi II e IV e proprio all'azione sulla topoisomerasi II sembra sia dovuta la marcata attività battericida riscontrata in vitro nei confronti di *P.aeruginosa*.

Metodi. Nel nostro studio abbiamo valutato l'attività in vitro di Prulifloxacin versus *P.aeruginosa* e confrontato i risultati con quelli ottenuti con Ciprofloxacina e Levofloxacina.

150 isolati clinici di *P.aeruginosa*, di cui 75 risultati resistenti alla Ciprofloxacina (MIC ≥ 4), sono stati sottoposti a test di sensibilità a Prulifloxacin, Ciprofloxacina e Levofloxacina con metodica di diffusione in agar (Kirby-Bauer) su terreno Mueller Hinton agar, utilizzando dischetti con concentrazioni di 5µg. L'interpretazione ed i controlli di qualità (*P.aeruginosa* ATCC 27853) sono stati effettuati secondo le indicazioni NCCLS (M100-S16).

Risultati. I 75 ceppi di *P.aeruginosa* risultati resistenti a Ciprofloxacina sono stati confermati tutti con la tecnica di diffusione in agar; 5 di questi isolati hanno presentato sensibilità intermedia a Prulifloxacin e tutti sono risultati resistenti a Levofloxacina. Dei 75 ceppi risultati sensibili a Ciprofloxacina 13 sono risultati resistenti e 4 con sensibilità intermedia a levofloxacina, mentre tutti si sono dimostrati sensibili alla Prulifloxacin. I diametri degli aloni di sensibilità hanno presentato distribuzioni modali differenti per le tre molecole: Ciprofloxacina ha presentato un unico picco corrispondente a 33 cm, Levofloxacina una distribuzione trimodale con picchi a 20,26 e 28 cm, Prulifloxacin una distribuzione bimodale a 30 e 35 cm.

Conclusioni. Prulifloxacin conferma una migliore attività in vitro rispetto a Levofloxacina e sostanzialmente equivalente alla attività di Ciprofloxacina nei confronti della quale ha il vantaggio della monosomministrazione giornaliera e quindi una migliore compliance del paziente a parità di costi per ddd.