

paziente di sesso maschile, dell'età di 66 anni, con familiarità negativa per patologie cardiovascolari, ex fumatore, non storia di potus, né diabete e/o dislipidemie e/o patologie di rilievo all'anamnesi patologica remota. Ricoverato nel novembre 2003 presso la divisione di cardiologia dell'Ospedale SS. Annunziata di Sassari per sindrome coronaria acuta con ostruzione IVA prossimale, venivano riscontrati i seguenti valori ematochimici: VES 47, PCR 19, leucocitosi neutrofila (11.000 GB con >70% N); buona la funzionalità renale ed epatica. Ad un non riuscito tentativo di disostruzione coronarica, in attesa di intervento di by-pass aorto-coronarico si accompagnava rialzo termico con febbre elevata >38°C. All'ecocardiogramma, in assenza di focolai polmonari ed ecotomografia addominale nella norma, si rilevava lieve ipertrofia parietale e presenza di versamento pericardico lieve-moderato; sulla base di tali riscontri si eseguivano numerosi prelievi venosi seriati per esami emoculturali e contemporaneamente veniva avviata terapia antibiotica ad ampio spettro con cefalosporine di terza generazione, teicoplanina per via ev ed acido acetilsalicilico ad alte dosi; a distanza di otto giorni non si rilevava alcun beneficio clinico ed anzi si manifestava progressivo aumento del versamento pericardico con segni di tamponamento cardiaco associato a grave anemia normocromica normocitica (Hb 6.2 g. x dl.). Trasferito presso il reparto di Medicina per ulteriori accertamenti e sottoposto ad emotrasfusione ed ulteriori esami culturali, si isolava da una delle emocolture inviate all'unità operativa di Microbiologia clinica del Laboratorio analisi ospedaliero una *Listeria monocytogenes*. Tale rilevazione rendeva possibile formulare la diagnosi di miocardite infettiva da *Listeria* e permetteva il corretto orientamento di una terapia antibiotica combinata mirata con penicillina ed aminoglicosidi per quattro settimane. Già in seconda giornata era possibile osservare una buona risposta clinica e, dopo un mese di terapia, il paziente veniva dimesso in ottime condizioni, con nessun segno di versamento pericardico; attualmente esita modesto ispessimento pericardico ed è stato programmato intervento di rivascularizzazione miocardica.

P030

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI MRSA MEDIANTE UTILIZZO DI RIBOPRINTER®, RAPD E PFGE: ANALISI COMPARATIVA

Catalano A., Bonfitto M.G., Piana F., Cirillo D.M., Marchiaro G.

SC Microbiologia ASO San Giovanni Battista cso Bramante 88 - 10126 Torino

Introduzione. Gli MRSA sono una causa persistente di infezioni nosocomiali a decorso grave. L'identificazione precoce di cloni "ospedalieri" è fondamentale per la sorveglianza negli ospedali di tutte le infezioni da MRSA. La caratterizzazione dei ceppi permette di rilevare tempestivamente eventuali microepidemie ed istituire le misure di controllo necessarie per arrestarle. In particolare la possibilità di ottenere un profilo genotipico (fingerprint) di ogni singolo isolato consente di delineare con certezza il percorso interumano dei ceppi. Negli ultimi anni sono state proposte diverse tecniche per la genotipizzazione tra le quali la ribotipizzazione automatica mediante Riboprinter®, la *Random Amplified Polymorphic DNA* e la *Pulsed Field Gel Electrophoresis*.

Scopo del lavoro. Lo scopo di questo lavoro è stata la valutazione delle 3 tecniche elencate sopra secondo diversi parametri quali la rapidità e la semplicità di esecuzione, la capacità discriminatoria e la riproducibilità dei dati.

Materiali e metodi. A tale scopo sono stati tipizzati 77 ceppi di MRSA isolati da materiali patologici, 69 dei quali provenienti da reparti diversi dell'Ospedale Maggiore San Giovanni Battista di Torino e 8 da ospedali esterni.

La tipizzazione in PFGE è stata eseguita mediante l'utilizzo dell'enzima *Sma1* e seguendo il protocollo descritto altrove, mentre il sistema Riboprinter® l'enzima *EcoRI*.

La RAPD è stata effettuata con i primer forniti dal kit Ready-To-Go™ RAPD Analysis Kit (Amersham Biosciences) e seguendo le procedure indicate dal produttore.

L'analisi dei patterns è stata effettuata mediante il software Bionumerics 2.5 per la rivelazione dei clusters.

Risultati. L'analisi eseguita mediante RAPD ha permesso di individuare 35 profili differenti (costituiti da un numero di bande compreso tra 1 e 5), all'interno dei quali 56 ceppi sono stati inclusi in 14 clusters con indice di similitudine del 100% cioè in raggruppamenti costituiti da profili identici. I 14 clusters sono costituiti 1 da 11 ceppi; 1 da 9; 1 da 7; 1 da 5; 1 da 4; 2 da 3 e 7 da 2 ceppi. L'indice di clusterizzazione è risultato essere 72.7% (56 ceppi/77)

L'analisi mediante PFGE ha evidenziato, invece, 45 pulsotipi differenti all'interno dei quali 45 ceppi sono stati inclusi in 14 clusters (IS=100%) formati a loro volta da 1 cluster da 7; 1 da 6; 1 da 4; 6 da 3 e 5 da 2. L'indice di clusterizzazione della PFGE è 58.4%

La ribotipizzazione automatica mediante Riboprinter® ha individuato 16 ribotipi. I cluster rilevati dal Riboprinter® sono stati 7: il ribotipo 19-S-6 comprende 16 ceppi, il 90-S-1 37, il 207-S-2 3, 4 il 90-S-8, 2 il 210-S-4, 4 il 105-S-7, 2 il 19-S-1. L'indice di clusterizzazione è stato del 88.3%.

Esperimenti ripetuti hanno evidenziato l'ottima riproducibilità della PFGE e del Riboprinter® mentre la riproducibilità ottenuta mediante la tecnica del random priming si è rivelata insufficiente. Per quanto riguarda i tempi di esecuzione sono risultati prolungati per la PFGE (una settimana) mentre la metodica RAPD permette di ottenere una tipizzazione in una giornata lavorativa; infine la tipizzazione mediante Riboprinter® abbina ai tempi rapidi di esecuzione la quasi completa automatizzazione.

Per quanto riguarda i costi essi risultano modesti per la RAPD, medio-alti per la PFGE, mentre sono rilevanti per il sistema automatizzato Riboprinter®.

Conclusioni. Lo studio comparato di tali metodiche ci ha permesso di confermare quanto noto in letteratura: la metodica PFGE è il "gold standard" per lo studio epidemiologico degli MRSA, mentre il Riboprinter®, pur essendo di rapida e semplice esecuzione ed evidenziando un'ottima riproducibilità del sistema, si è dimostrata una tecnica meno discriminante i cui risultati devono essere confermati dalla PFGE. Il sistema automatico può essere utilizzato come metodica di screening su numerosi ceppi. Infine la RAPD si è dimostrata una metodica applicabile a epidemie di differenti patogeni.

BIBLIOGRAFIA:

1. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R. V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis; criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiology*. 1995; 33:2233-2239.
2. Prevost G., Jaulhac B., Piemont Y. DNA fingerprint by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *S.aureus* isolates *J Clin Microbiology* 1992; 30: 967-73.
3. Saulnier P., Bourneix C., Prevost G., Andremont A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strain of methicillin-resistant *S.aureus* *J Clin Microbiology*. 1993; 31: 1964-70.