

M053**LA RESISTENZA ALLA COLONIZZAZIONE DI CATETERI MEDICATI CON ARGENTO-SULFADIAZINA E CLOREXIDINA**

Monzillo V.; Lanzarini P.; Corona S.; Tamburnotti C.; Marone P.

Dipartimento di Malattie Infettive, IRCCS S.Matteo, Università di Pavia, Pavia

In questi ultimi anni sono state impiegate due principali strategie nella prevenzione delle infezioni legate all'utilizzo di cateteri: la messa a punto di biomateriali con bassa affinità per i microrganismi usando metodiche chimico-fisiche e l'incorporazione di principi attivi quali antisettici ed antibiotici nei polimeri per ridurre l'adesione dei batteri alle superfici. Nel nostro studio abbiamo valutato l'adesione in vitro di stafilococchi a cateteri in poliuretano ricoperti con argento-sulfadiazina e clorexidina. E' stata studiata comparativamente l'adesività di un ceppo di *Staphylococcus epidermidis* produttore di slime a cateteri trattati e non con antimicrobici. Frammenti di cateteri di 5 mm di lunghezza sono stati messi a contatto con una brodocoltura overnight di *S.epidermidis* slime-produttore diluita 1:1000 in TSB addizionato di 0.25 % di casaminoacido. Dopo 24 h di incubazione a 37 °C i cateteri sono stati rimossi dalla brodocoltura, lavati, sonicati e il liquido di sonicazione è stato opportunamente diluito per la conta su terreno solido. L'esperimento è stato eseguito in quadruplo. Un quinto frammento di catetere, dopo incubazione, è stato processato per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione. Parallelamente altri frammenti di cateteri sono stati incubati a 37°C in PBS che è stato sostituito giornalmente fino al momento dell'infezione. Il PBS rimosso veniva congelato a -20°C per la valutazione dell'attività antibatterica. I cateteri in PBS venivano infettati dopo 24 h - 48 h - 7 gg - 14 gg - 21 gg - 28 gg di incubazione. I risultati da noi ottenuti dimostrano chiaramente che il trattamento dei cateteri con argento-sulfadiazina e clorexina riduce notevolmente, a tutti i tempi considerati, la formazione di biofilm da parte di *S.epidermidis* slime-produttore. Il numero dei microrganismi adesi ai frammenti di catetere non trattato varia da 2×10^5 a 9×10^5 batteri per frammento ai diversi tempi. Al contrario nelle prime 48 ore non è stata evidenziata adesione di nessun microrganismo ai cateteri trattati e solo dopo 4 settimane il numero di stafilococchi adesi arrivava a 103 per frammento. L'attività antibatterica del PBS contenente gli agenti antimicrobici rilasciati dai frammenti di catetere ai vari tempi è stata calcolata come la massima diluizione in grado di inibire la crescita del ceppo di *S.epidermidis* utilizzato per lo studio, ed era pari ad 1:16 dopo 24 ore di incubazione, ad 1:4 dopo 48 ore e ad 1:2 dopo 96 ore. Le osservazioni mediante microscopia elettronica a scansione hanno sostanzialmente confermato i dati ottenuti nello studio in vitro. In conclusione i cateteri trattati con antimicrobici hanno mostrato una minor affinità per gli stafilococchi rispetto ai cateteri non trattati.

M054**VALUTAZIONE DI UN NUOVO TEST COLORIMETRICO PER LA RILEVAZIONE DEL POTERE ANTIBATTERICO RESIDUO NELLE URINE**

Tizianel G., Boschian M., Bruschetta G., Favero L., Zigante P., Camporese A.

S.O. di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica Azienda Ospedaliera "S.Maria degli Angeli" - Pordenone

La valutazione del Potere Antibatterico Residuo (PAR) consente di rilevare la presenza di un antimicrobico nei liquidi biologici. Esistono attualmente sul mercato diversi metodi per l'esecuzione del PAR TEST che utilizzano differenti substrati e le più varie metodologie, più o meno pratiche e più o meno automatizzabili nella routine diagnostica. Nel nostro laboratorio viene utilizzato attualmente un metodo *in house* costituito da due piastre di agar germi, l'una inocolata con un ceppo ATCC 25923 di *Staphylococcus aureus Oxford, FDA approved*, e l'altra inocolata con un ceppo ATCC 25922 di *Escherichia coli FDA approved*, entrambe validati da NCCLS per i test di sensibilità in vitro.

Nel test attualmente in uso nel nostro laboratorio, in ciascuna piastra di agar germi sono scavati 8 pozzetti, in ognuno dei quali vengono depositati 50 microlitri dell'urina in esame. La lettura viene eseguita dopo 18 ore valutando l'eventuale presenza di un alone di inibizione intorno al pozzetto in cui è stato depositato il campione. In caso di presenza di alone in almeno una delle due piastre di agar germi il PAR è considerato positivo, mentre in assenza di alone in entrambe le piastre il PAR test viene considerato negativo. Per migliorare il flusso di lavoro del nostro laboratorio, che esegue circa 18.000 urinocolture l'anno comprensive di PAR test, è stato valutato un nuovo test colorimetrico per l'individuazione del potere antibatterico residuo, prodotto e distribuito dalla ditta DIESE di Siena.

In questo test, spore di *Bacillus subtilis* ATCC 6633, scelte per la loro sensibilità a tutti gli antibiotici, vengono essiccate in pozzetti contenenti il terreno, costituito da Eugon broth addizionato con agar e tetrazolio e un indicatore di crescita. Il campione di urina inocolato ripristina il terreno. La micropiastra, costituita da una serie di strips per un totale di 48 pozzetti, è sezionabile in modo da consentire all'operatore di distribuire il numero di test in base alle necessità dei flussi di lavoro del laboratorio. Una volta inocolata con i vari campioni di urina, la micropiastra viene sigillata con un foglio adesivo in dotazione e incubata a 37°C per 18 ore. La lettura ottica consente di considerare negativi i campioni nei quali si sviluppa un pigmento rosso (qualsiasi minima evidenza di viraggio del substrato è da considerarsi come risultato negativo), mentre sono considerati positivi quei campioni nei quali il terreno rimane di colore giallo: il viraggio del colore dei pozzetti negativi è riferibile, infatti, alla crescita di *Bacillus subtilis* con il conseguente viraggio dell'indicatore colorimetrico.

Abbiamo testato in diverse sessioni un totale di 537 campioni di urina ottenuti da pazienti ricoverati e ambulatoriali. Per verificare l'attendibilità del test, le urine sono state seminate in doppio sia su micropiastra sia sulle due piastre di agar germi utilizzate di routine nel nostro laboratorio per l'esecuzione del PAR test. Dopo un periodo di incubazione di 18 ore si è proceduto alla lettura dei due metodi, confrontandone i risultati.

Il ceppo di *Bacillus subtilis* ATCC 6633, utilizzato per la realizzazione del test, è stato inoltre testato a tutti gli antibiotici comunemente impiegati per la terapia delle infezioni delle

vie urinarie per validarne la risposta in vitro.

Su un totale di 537 test eseguiti, 488 (90.8 %) sono risultati concordanti, mentre 49 (9.1 %) hanno evidenziato un diverso risultato rispetto al controllo, con una distribuzione relativamente omogenea tra i 26 campioni falsi negativi, pari al 4.8 % sul totale (con viraggio del colore nel pozzetto e contemporanea presenza, invece, di aloni di inibizione in almeno una delle due piastre di agar-germi), e i 23 campioni falsi positivi, pari al 4.2 % sul totale (con assenza di viraggio del colore nel pozzetto e assenza di aloni di inibizione in entrambe le due piastre di agar-germi).

È evidente dunque che il test presenta una discreta percentuale di campioni che non concordano con la realtà clinica, come del resto accade con altri analoghi sistemi commerciali, con una percentuale di falsi negativi solo lievemente superiore a quella dei falsi positivi. A questo proposito è noto che, in termini di appropriatezza della risposta, un trattamento antimicrobico misconosciuto al microbiologo è in grado di indurre una notevole percentuale di risultati falsamente negativi delle urinocolture (Rigoli, 1980; Crotti, 1982), ma d'altro canto anche un PAR test falsamente negativo induce a scartare urine con basse cariche microbiche, fisiologicamente non rilevanti, sottostimando al tempo stesso un evento "critico" come l'inefficacia della terapia in atto. Non si dimentichi, infatti, che uno dei vantaggi dell'esecuzione del PAR test consiste proprio nella possibilità di intervenire sul risultato dell'urinocoltura in modo più ragionato: in questo senso, ad esempio, una positività del test in presenza di una ridotta carica microbica suggerisce di procedere con l'analisi della sensibilità del ceppo per verificare un'eventuale sopravvenuta refrattarietà al trattamento praticato. La percentuale di falsi positivi riscontrata, perciò, oltre a rappresentare di per sé un rilevante *pitfall* analitico (le cui cause meriteranno una valutazione più approfondita), indurrebbe il microbiologo a un'interpretazione inutilmente più restrittiva di urine altrimenti non significative dal punto di vista clinico, diminuendo in questo modo ancora una volta l'appropriatezza della risposta. Questi elementi di criticità vanno comunque rapportati con una notevole praticità del test e con un costo relativamente contenuto, che giustificano l'ipotesi di procedere a un'analisi più approfondita dei motivi che possono avere influito negativamente sulle dinamiche analitiche e a una valutazione del livello di sensibilità anche *versus* altri analoghi sistemi commerciali attualmente in uso in molti laboratori e alternativi al test in piastra.

M055

SETTICEMIA NEONATALE DA LISTERIA MONOCYTOGENES: CASO CLINICO

Allù M.T., Battaglia C.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, \ Ospedale M.P.Arezzo Ragusa.

Introduzione *Listeria monocytogenes* è un bacillo gram-positivo, asporigeno, anaerobio facoltativo. Studi sull'uomo hanno evidenziato la presenza di portatori asintomatici dal 5% al 44%. Gli individui a più alto rischio nel contrarre la listeriosi sono le donne in gravidanza, i loro feti, i neonati, i pazienti immunodepressi per malattia specifica o per terapia immunosoppressiva.

La *Listeria* è trasmissibile dalla madre al feto per via ematogena, per via ascendente attraverso membrane integre e per contagio durante il passaggio nel canale del parto, è responsabile di aborto, parto pretermine, febbre intrapartum, morte fetale intrauterina e perinatale. La listeriosi neonatale si pre-

senta in due forme: la precoce (*early onset*) legata a trasmissione transplacentare, caratterizzata da setticemia; la tardiva (*late onset*) associata a trasmissione intrapartum caratterizzata spesso da meningite.

Scopo del lavoro Descrivere un caso di setticemia da L.M. in una neonata pretermine.

Materiali e metodi Gravida alla 28esima settimana di gestazione accusa febbre e disturbi gastrointestinali. La donna partorisce alla 30esima settimana di gravidanza. La neonata alla nascita presenta edemi diffusi e idrope; vengono immediatamente eseguiti gli esami ematochimici (emocromo: globuli bianchi 19.000/mm³; piastrine 91.000/mm³; PCR 22mg/l) ed emocoltura utilizzando un flacone pediatrico PED/PLUS della BD. Viene instaurata prontamente terapia antibiotica con ampicillina-sulbactam (100 mg x 3/die per 14 giorni) e amikacina (15 mg x 2/die per 14 giorni). L'emocoltura si positivizza dopo 12 ore di incubazione. Dall'emocoltura viene eseguito un vetrino per la colorazione di gram, si osservano bacilli gram-positivi. Viene fatta comunicazione immediata al reparto. Si eseguono delle subcolture su agar sangue di pecora e agar cioccolato, le piastre vengono incubate in aerobiosi ed in atmosfera di CO₂ al 5-10% a 37°C. Dopo 24 ore di incubazione si sono sviluppate delle colonie piccole, traslucide, grigie con un sottile alone di β-emolisi che non eccede la colonia. Il test della catalasi risulta positivo, l'esame microscopico evidenzia cocco-bacilli gram-positivi. Si procede all'identificazione biochimica utilizzando le gallerie API-LISTERIA e API-CORYNE (BIOMERIEUX).

Risultati L'identificazione biochimica ha dato come risultato L.M. Dopo il 6° giorno le condizioni cliniche della neonata migliorano, i controlli ematochimici, difatti, rilevano PCR=1mg/l e piastrine 173.000/mm³.

Conclusioni Come per le altre infezioni materne, l'identificazione dei casi a rischio, la diagnosi precoce e la terapia tempestiva rappresentano i punti fondamentali per ridurre i tassi di mortalità dovuti alla *Listeria*.

M056

PROBLEMATICHE DIAGNOSTICHE NELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Pegoraro M., Maccacaro L., Fontana R.

Servizio di Microbiologia, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera di Verona

Introduzione: grazie alla semplicità di esecuzione e alla rapidità con cui permette di ottenere un risultato, la ricerca dell'antigene urinario specifico è diventato l'approccio più largamente utilizzato nella diagnosi di infezione da *Legionella pneumophila*. L'obiettivo di questo studio vuole essere una valutazione critica dei risultati ottenuti in due anni di utilizzo combinato di diversi metodi di indagine nella diagnosi di legionellosi.

Materiali e metodi: nel nostro laboratorio la diagnostica delle infezioni da *L. pneumophila* si basa sulla ricerca dell'antigene urinario (Legionella Urin Antigen EIA, Biotest), sull'esame colturale e sulla ricerca sierologica (Legionella Mix1/Mix4/Mix2/Mix3, Euroimmun).

Risultati: nel 2001 sono stati sottoposti a ricerca di antigene di *L. pneumophila* 79 campioni di urina provenienti da 72 pazienti. La positività è stata riscontrata nel 7.6% (6 pazienti). 5 i materiali inviati per la ricerca colturale provenienti tutti da pazienti con positività dell'antigene urinario specifico: 4 broncolavaggi sono risultati positivi per *L. pneumo-*