

phila sierotipo 1, un espettorato è risultato negativo. Di 3 pazienti (due positivi all'esame colturale ed uno negativo) per i quali è stato possibile disporre del siero acuto e del siero convalescente solo due hanno mostrato un aumento significativo del titolo anticorpale nel secondo prelievo. Dei restanti casi erano disponibili solo i campioni corrispondenti alla fase acuta di malattia (2 casi) risultati negativi o non era stato inviato alcun campione (1 caso). L'indagine sierologica ci ha inoltre permesso di stabilire una diagnosi presunta di legionellosi in 3 pazienti di cui non erano state fatte altre indagini.

Nel 2002 sono stati analizzati 214 campioni di urina, corrispondenti a 180 pazienti. La positività è stata riscontrata con certezza nel 6.1% (11 pazienti), mentre nell'1.1% (2 pazienti) è risultata dubbia. 7 pazienti (3 positivi e 3 negativi all'antigenuria e uno non valutato) sono stati sottoposti a esame colturale di materiali respiratori, ma solo in un caso si è avuto risultato positivo per *L. pneumophila* sierotipo 1 (il paziente era positivo all'antigenuria). Di 4 pazienti con positività dell'antigene urinario verificammo la sieroconversione; di altri 6 ricevemmo solo il campione di sangue in fase acuta, di un paziente non abbiamo alcun dato sierologico. In un paziente con antigenuria dubbia il titolo anticorpale è rimasto basso (1:128) in due campioni di sangue inviati con un intervallo di 15 giorni e nell'altro è stata riscontrata la negatività nell'unico campione inviato. La sieroconversione è stata riscontrata in un paziente di cui non erano state fatte altre indagini.

Discussione: la riduzione del numero di campioni inviati per indagini colturali (dal 7% del 2001 al 4% del 2002) e per conferme sierologiche (dal 50% al 38%) indica la tendenza a basare la diagnosi di legionellosi essenzialmente sul risultato fornito dalla ricerca dell'antigenuria. Tale impostazione diagnostica è, secondo noi, limitante ed in alcuni casi fuorviante. In almeno 9 casi il risultato positivo o debolmente positivo non è stato confermato dalla ricerca sierologica. Riteniamo perciò che la ricerca dell'antigenuria, seppur estremamente valida come test rapido, non possa rappresentare l'unico approccio diagnostico in questo tipo di infezioni.

M057

UREAPLASMA UREALYTICUM : EPIDEMIOLOGIA E ANTIBIOTICO - RESISTENZA .

* Daghetta L., **Ricci S.

*Laboratorio analisi - Sant'Ambrogio - Vigevano(PV)

**Ambulatorio ginecologico Vigevano-(PV)

Ureaplasma urealyticum è un batterio appartenente alla famiglia delle Mycoplasmataceae, caratterizzato da dimensioni estremamente ridotte e dall'assenza di parete cellulare, che viene isolato con elevata frequenza dal tratto genito-urinario.

Dopo la pubertà la colonizzazione genitale avviene primariamente come risultato di un contatto sessuale, con l'aumento dell'esperienza sessuale e del numero dei partners la percentuale di donne portatrici sale rapidamente sino a raggiungere livelli variabili dal 20% al 75%, con punte massime d'incidenza nelle fasce sociali con comportamento sessuale a rischio (nomadi, extracomunitari, mondo della prostituzione). Una prevalenza così elevata in donne sane rappresenta l'elemento principale che contrasta l'ipotesi di un ruolo patogeno effettivo dei Mycoplasmi nella patologia genitale. Tuttavia essi sono stati isolati, solo o in associazione ad altri patogeni, in

diverse condizioni patologiche quali: l'ascesso della ghiandola del Bartolino, le vaginiti, la vaginosi batterica, la malattia infiammatoria pelvica, la febbre postabortiva e postpartum, l'infertilità, la sterilità, il basso peso alla nascita e la morte fetale in utero.

Scopo: obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare la frequenza e l'antibiotico-resistenza di *Ureaplasma Urealyticum* in tamponi endocervicali e/o uretrali pervenuti in laboratorio, dietro richiesta dello specialista.

Sono stati presi in esame 405 pazienti, 39 maschi (10%) e 365 femmine (90%) con età media di anni 34 afferenti al Laboratorio nel periodo compreso fra maggio 2002 e aprile 2003. Nei campioni positivi è stata inoltre valutata l'associazione con altri microrganismi potenzialmente patogeni e infine è stato valutato l'andamento dell'antibiotico-resistenza di *Ureaplasma Urealyticum*.

Materiali e Metodi: la ricerca per *Ureaplasma Urealyticum* è stata eseguita utilizzando il kit "mycoplasma IST 2" della Ditta bio-Merieux che consente non solo l'identificazione ma anche di saggiare la sensibilità dei ceppi isolati verso 9 diversi antibiotici; inoltre si è valutata l'associazione dei campioni positivi con altri microrganismi potenziali patogeni.

Risultati: dei 405 campioni esaminati ne sono risultati positivi 115 (28%) di cui 10 tamponi uretrali e 105 tamponi endocervicali. Sui 115 campioni positivi per *Ureaplasma Urealyticum*, 33 (28%) mostravano un'associazione batterica e/o micotica così distribuita: Streptococco agalactiae (5), *Gardnerella vaginalis* (8), *Candida albicans* (20).

Per quanto riguarda la sensibilità agli antibiotici si è verificata una diminuzione delle sensibilità verso Ofloxacina (43%) ed Eritromicina (44%), mentre per Doxiciclina, Josamicina, Tetraciclina, Ciprofloxacina, Azitromicina, Claritromicina e Pristinamicina hanno mostrato una sensibilità superiore al 95%.

Conclusioni: dai dati in nostro possesso emerge una elevata incidenza di *Ureaplasma Urealyticum* nel tratto genito-urinario femminile rispetto a quello maschile. La percentuale di positività da noi riscontrata concorda con i dati della letteratura a favore di una popolazione non considerata a rischio. *Ureaplasma Urealyticum* è un patogeno che, nella nostra casistica, non ha mostrato grande variabilità sull'andamento delle resistenze verso gli antibiotici di elezione ma possiamo segnalare un aumento di resistenze intorno al 44% verso quegli antibiotici a largo spettro che vengono usati in prima battuta per infezioni comuni.

M058

UTILIZZAZIONE DELLE PIASTRE ORSA PER L'IDENTIFICAZIONE DI CEPPI MRSA DA EMOCOLTURE POSITIVE

Burdino E., Cirillo D., Bonfitto M.G., Friscale L., Quaranta M.R., Riccabone A., Marchiaro G.

Laboratorio di Microbiologia Clinica AO San Giovanni Battista, cso Bramante 88, Torino

S. aureus meticillino-resistente (MRSA) rappresenta il patogeno più frequentemente isolato in ambiente nosocomiale ed è in aumento come causa di infezioni comunitarie. Queste infezioni si accompagnano ad un'elevata morbilità e mortalità, particolarmente in pazienti con batteriemia. In questo contesto l'appropriata terapia per il paziente ed il rapido riconoscimento dei portatori sono elementi critici per limitare la

diffusione nosocomiale dei ceppi. I metodi convenzionali per l'identificazione di MRSA richiedono un periodo d'incubazione variabile dopo il primo isolamento e non consentono una risposta presuntiva in tempi rapidi, inoltre non sempre è possibile discriminare correttamente ceppi resistenti. E' stata valutata la possibilità di utilizzare un terreno cromogenico antibiotato (ORSA) che sfrutta il blu di anilina per rilevare la fermentazione del mannitolo e consente l'identificazione presuntiva di ceppi MRSA derivati da emocolture. Questo terreno rileva in 24 ore la crescita di colonie di colore blu intenso. Sono stati seminati su piastre ORSA aliquote provenienti da 140 emocolture positive per la presenza di cocci gram-positivi in cluster. Dei 140 campioni saggiati 31 hanno dato origine a colonie blu presuntive di MRSA, 68 a colonie bianche (SCN-meticillino resistenti) e in 41 casi non si è avuta crescita (ceppi di SA e SCN non meticillino resistenti). Tutti i ceppi sono stati isolati su agar sangue e la meticillino resistenza è stata confermata (ricerca di PBP2A, amplificazione del gene *mecA* con due differenti coppie di primers specifici). L'identificazione biochimica ha confermato come MRSA 24/31 isolati che avevano originato colonie blu e come *S. haemolyticus* oxacillino-resistenti 7/31. In un caso l'utilizzo del terreno ORSA ha permesso la discriminazione di un ceppo di MRSA che non sarebbe stato riconosciuto dalle metodiche convenzionali. I nostri risultati indicano che il terreno ORSA può essere utilizzato per l'identificazione di MRSA da flaconi di emocolture

M059

PREVALENZA DI BETA-LATTAMASI DI TIPO CTX-M IN ISOLATI DI ESCHERICHIA COLI IN UN OSPEDALE DEL NORD ITALIA

^aMigliavacca R., ^cDell'Amico E., ^aNucleo E., ^bSpalla M., ^aAsticcioli S., ^dD'Andrea M., ^bMatti C., ^bDaturi R., ^cRossolini G.M., ^aPagani L.

^aDipartimento S.M.E.C. Sez. di Microbiologia, Università degli Studi di Pavia, via Brambilla 74, 27100 Pavia.

^bServizio Analisi Microbiologiche I.R.C.C.S. "S.Matteo", Viale Golgi 19, 27100 Pavia.

^cDipartimento di Biologia Molecolare, Sez. di Microbiologia, Università di Siena, Viale Bracci, 53100 Siena.

Scopo della ricerca. Determinare la prevalenza di enzimi di tipo CTX-M in isolati clinici di *Escherichia coli* produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), presso l'I.R.C.C.S. S.Matteo di Pavia.

Metodologia utilizzata. Sono stati raccolti, nel periodo Gennaio-Novembre 2002, 1240 ceppi di *E.coli*. 64 erano ESBL-positivi (5.2%) e 28 mostravano un fenotipo da CTX-M-produttori. Le MIC di cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP) ed aztreonam (ATM) sono state determinate mediante test di microdiluzione, come raccomandato dall'NCCLS (documento M7-A4). La produzione di ESBL è stata rivelata mediante il sistema di screening BD-Phoenix ed il test di sinergia del doppio disco utilizzando tazobactam e CTX, FEP, CAZ, ATM. Il trasferimento dei determinanti di resistenza è stato ottenuto mediante coniugazione. L'attività delle beta-lattamasi, separate mediante isoelectrofocusing (IEF) e rivelate utilizzando nitrocefina è stata testata, attraverso un saggio biologico, nei confronti di CTX, CAZ, FEP ed ATM. L'amplificazione degli alleli *bla*_{CTX-M} è stata effettuata con primer disegnati su regioni geniche altamente conservate. Il gene è stato caratterizzato mediante sequenziamento. I profili del DNA genomico, digerito con *NotI*, sono stati analizzati mediante elettroforesi in campo

pulsato (PFGE).

Risultati. 15 isolati erano caratterizzati da maggiore resistenza al cefotaxime che al ceftazidime. L'IEF degli estratti enzimatici grezzi degli stessi ha mostrato bande beta-lattamasiche multiple, fra cui una con pI 8.4 che, nel test biologico, era più attiva su CTX, FEP ed ATM che sul CAZ.

L'analisi PCR dei determinanti *bla*_{CTX-M} risultava positiva per 12 isolati. Il sequenziamento ha rivelato determinanti *bla*_{CTX-M-1} trasferibili mediante coniugazione. I profili dei CTX-M-produttori, ottenuti tramite PFGE, hanno evidenziato eterogeneità clonali.

Conclusioni. Le ESBL di tipo CTX-M stanno emergendo anche in Italia, contribuendo alla resistenza ai beta-lattamici in *E.coli*. La disseminazione plasmidica sembra essere il prevalente meccanismo di diffusione dei determinanti di resistenza fra i ceppi nosocomiali.

M060

RICERCA DI ESBL: SISTEMA VITEK 2 VS ETEST

Bonetti C., Fava L., Lucchi M.G., Mantovani L., Montanelli A.

Dipartimento di Patologia Clinica, AO Ospedale Maggiore di Crema

Scopo: La diffusione nei batteri Gram negativi di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) in grado di idrolizzare le cefalosporine di terza generazione e i monobattami è oggi ormai percentualmente significativa. È pertanto fondamentale per il microbiologo clinico riconoscere precocemente un patogeno antibiotico-resistente, sia per le implicazioni clinico-terapeutiche, sia per pianificare il controllo epidemiologico di tali patogeni. Abbiamo così confrontato il metodo di rilevazione del meccanismo di resistenza mediato dalle ESBL dello strumento Vitek 2 della ditta BioMérieux con la metodica dell'Etest (assunto come gold standard).

Materiali e metodi: Il Vitek 2 rileva la produzione di ESBL utilizzando il cefpodoxime, cefalosporina orale di terza generazione, ed elaborando i valori di MIC ottenuti tramite l'AES, il sistema esperto avanzato.

Da settembre 2002 ad aprile 2003 abbiamo raccolto 74 ceppi batterici produttori di ESBL così distribuiti:

BATTERI	MATERIALI	REPARTI
40 P. MIRABILIS	62 URINOCOLTURE	42 CASE DI RIPOSO
16 E. COLI	10 TAMPONI DA PUS	10 ONCOLOGIA
7 P. STUARTI	2 ESPETTORATI	10 SSN
4 K. PNEUMONIAE		6 NEUROLOGIA
4 M. MORGANII		4 UT
12 S. MARCESCENS		2 CHIRURGIA
1 E. CLOACAE		

I 74 ceppi sono stati testati con l'Etest ESBL. Sono strisce impregnate di sostanza antibiotica, nelle quali vi sono, a ciascuno dei due estremi, gradienti di concentrazione di un β-lattamico e dello stesso β-lattamico con l'aggiunta di una concentrazione fissa di acido clavulanico. Sono disponibili strisce con ceftazidime (TZ) e cefotaxime (CT), entrambe utilizzate nel nostro studio. Il ceppo è ESBL positivo se il rapporto tra la MIC di TZ o di CT e la MIC di TZL o di CTL è ≥ 8 o se vi sono deformazioni dell'ellisse.

Risultati: Con la metodica dell'Etest 3 dei 74 ceppi sono risultati non produttori di ESBL e 5/74 non determinabili, in quanto i valori di MIC erano al di fuori dei ranges del test.

Conclusioni: La diagnosi di un'infezione sostenuta da un ceppo ESBL positivo pone numerosi problemi, in quanto richiede l'uso di tecniche costose ed indagose, che non