

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 cocchi 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

sempre trovano posto nella routine del laboratorio di microbiologia. Il nostro studio ha dimostrato che lo strumento Vitek 2 può essere un valido ausilio in quanto si è dimostrato di semplice applicazione, affidabile e poco costoso.

M061

UTILIZZO DELLA STRAND DISPLACEMENT AMPLIFICATION NELLA DIAGNOSI DELLE MICOBATTERIOSI

Dodaro S., Filia M.A. e Cavalcanti P.

Servizio di Microbiologia e Virologia, P.O. Annunziata, via Zara, 87100 Cosenza

Nell'ultimo decennio, la necessità di porre diagnosi di micobatteriosi in tempi brevi si è sentita particolarmente e ciò in relazione al rilievo di tale tipo di infezione nei soggetti immunocompromessi, nei quali è possibile riscontrare come agente etiologico sia il *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) sia il gruppo dei micobatteri non tubercolari (NTM). La diagnosi differenziale fra questi due gruppi di agenti microbici, fondamentale ai fini di un corretto approccio terapeutico, ha determinato la necessità di mettere a punto metodiche rapide ed affidabili in grado di rispondere a tale quesito in tempi assai brevi. L'amplificazione degli acidi nucleici (NAA) ha risposto bene a questa esigenza e tra le varie tecniche che sfruttano tale principio, nel nostro laboratorio abbiamo utilizzato la Strand Displacement Amplification (SDA) che è una tecnica in vitro di amplificazione isoterica del DNA del MTC da campione biologico. Tale tecnologia è completamente automatizzata con un sistema chiamato BDProbeTecET. Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare il valore predittivo della SDA.

A tal fine, negli anni 2001 e 2002, 1614 campioni biologici sono stati sottoposti ad indagini microscopico-culturali e SDA. Sono stati isolati 19 ceppi di MTC e 33 ceppi di NTM.

Premesso che il metodo di riferimento è l'esame colturale abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

se la microscopia è positiva, la SDA ha un valore predittivo sia in senso positivo che in senso negativo del 100%;

se la microscopia è negativa, il valore predittivo della SDA si modifica nettamente per la presenza di falsi positivi e, soprattutto, di falsi negativi.

Da ciò le considerazioni seguenti:

le tecniche di NAA, quale la SDA da noi utilizzata, sono certamente valide in caso di esame microscopico positivo; in caso di negatività dell'esame microscopico rimane fondamentale il dialogo con il clinico.

M062

SIERODIAGNOSI DI TBC: UTILITA' CLINICA DI DUE TEST ELISA: PATHOZYME-MYCO e TB-TEST

G. Ciarrocchi¹, A.M. Neri¹, G. Rondello, M. Tocchini¹, E. Cimarelli², P.G. Zitti³, R. Del Gobbo⁴, F. Burzacchini⁴, M. Dini⁴

^{1,3,4}A.O. "Umberto I°" Ancona; ²A.S.L. Jesi (AN) | U.O. Laboratorio Analisi, ²U.O. Broncopneumologia, ³U.O. Pneumologia, ⁴U.O. Malattie Infettive.

Scopo. Verificare la Sensibilità, la Specificità e la utilità clinica di due test sierologici elisa, basati sull'impiego di differenti antigeni micobatterici, nella ricerca di anticorpi anti-*Mycobacterium* IgG, IgA, IgM, in casi di tubercolosi polmo-

nare ed extra-polmonare.

Metodi. Un totale di 123 sieri, appartenenti ai seguenti gruppi di soggetti: a) 23 pazienti con tbc polmonare (20) ed extra-polmonare (3); b) 10 pazienti con patologie polmonari non tbc; c) 10 pazienti con quadro clinico sconosciuto; d) 80 donatori sani, furono esaminati per la ricerca di anticorpi anti-*Mycobacterium* mediante l'impiego di due test elisa, aventi per coating due diversi estratti di antigeni micobatterici: 1) PATHOZYME-MYCO OMEGA Ltd-RADIM Italia: miscela di Lam e 38 kD ricombinante; 2) TB-TEST-EURO-SPITAL Italia: estratto di A-60 da *M.bovis*.

Il gruppo di 23 pazienti tbc era suddiviso in: 5 casi di tbc-I°, 12 casi di tbc post-I° <2 anni, 6 casi di tbc post-Ia >2 anni. L'infezione tubercolare fu considerata clinicamente attiva in 21/23 pazienti. Il test PATHOZYME-MYCO fu eseguito in automazione su analizzatore ALISEI-RADIM; il TB-TEST fu eseguito manualmente secondo le procedure indicate.

Il "gold standard" era rappresentato dalla diagnosi clinico-radiologica e/o dall'isolamento di *M.tuberculosis* con metodi microbiologici convenzionali e di amplificazione genica.

Risultati. Adottando il criterio di positività sulla base dei soli risultati positivi, l'insieme del gruppo dei 23 pazienti tbc mostrò con il PATHOZYME IgG, IgA, IgM una Sensibilità rispettivamente di 73.9%, 43.4%, 34.7%; la media per i tre isotipi fu del 50.7%. Il TB-TEST mostrò in parallelo valori di Sensibilità di 62.5%, 52.1%, 34.7% ed una media di 49.8%.

Nel sottogruppo di 5 pazienti tbc-I°, 4/5 sieri risultarono IgM positivi ad entrambi i test, IgG positivi in 0/5, IgA positivi in 1/5. Nei due restanti sottogruppi entrambi i test evidenziavano elevati valori per IgG (11/12 e 10/12, rispettivamente) ed in minor misura per IgA. La specificità ottenuta con PATHOZYME in 90 sieri (80 donatori + 10 pazienti non tbc) per IgG, IgA, IgM, fu rispettivamente di 95%, 100%, 92.5%; TB-TEST ottenne 80%, 67.5%, 77.5%.

Conclusioni. I valori di Sensibilità per i due test appare soddisfacente qualora i risultati vengano valutati tenendo conto del diverso significato delle classi anticorpali nei differenti stati infettivi dei pazienti tbc.

La Specificità del PATHOZYME-MYCO risulta più elevata per tutti i tre isotipi in entrambi i gruppi non tbc.

Lo studio ha altresì rivelato la capacità dei test sierologici (IgG+IgA+IgM) di svelare una reazione umorale specifica, talora anche in assenza di isolamento batterico (due casi); viceversa, due altri casi non hanno mostrato positività sierologica, a fronte di produzione bacillifera, denotando una variabilità individuale nell'equilibrio immunologico umorale e celluloso-mediato.

Le soddisfacenti performances dei due test, in particolare del PATHOZYME-MYCO, unite alla facile adattabilità ad una esecuzione in automazione, sembrano arricchire di un utile presidio diagnostico la corretta valutazione clinica e lo stato infettivo delle micobatteriosi.

M063

TUTTO CI SI ASPETTAVA MA NON UN ELEPHANTIS

Cainarca M, Tarricone C, Attomanelli S, Guenzi I, Ferrarese M, Guagnellini E.

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia. Azienda Ospedaliera San Paolo. Milano

Una battuta scherzosa per introdurre un argomento che sicuramente non è tale: i Micobatteri. Con questo lavoro vogliamo descrivere la nostra esperienza negli anni 2001-02 confer-