

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-

mando, come già molti Autori, il ritrovamento sempre più frequente di Micobatteri non tubercolari (MNT) sia come quantità che come qualità. I campioni processati sono arrivati al nostro Laboratorio sia da pazienti interni all'ospedale sia da pazienti ambulatoriali. Tutti i campioni sono stati fluidificati e decontaminati con N-acetil-cisteina NaOH per 15° e neutralizzati con tampone fosfato pH 6.8. Dopo centrifugazione il sedimento viene risospeso con tampone fosfato per l'esecuzione dell'esame microscopico e colturale. I preparati microscopici, per la ricerca di bacilli alcool-acido resistenti sono stati colorati con la colorazione di Ziehl-Neelsen (carbolfucina a caldo); per l'esame colturale in terreno solido è stato inoculato un tubo di Lowenstein-Jensen, mentre per l'esame in brodo un flacone Bactec 12B come da istruzioni della ditta produttrice. I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

	Anno 2001	Anno 2002
Camp pervenuti	582	721
Camp non idonei	22	52
Camp processati	560	669
Camp inquinati	5%	4.5%
Espettorati	52%	55%
Urine	37%	27%
Altro	11%	18%
<hr/>		
Camp positivi	4.4%	8.9%
TBC	2.2%	5.4%
MNT	2.2%	3.5%

Tra i Micobatteri non tubercolari del 2002 abbiamo isolato un ceppo di *M. Elephantis* da escreato. La tipizzazione del ceppo è stata eseguita dal Dott. Tortoli con HPLA. Dai dati presenti in letteratura *M. Elephantis* è un micobattere atipico, a crescita rapida, non cromogenico, isolato da un ascesso polmonare di un elefante adulto morto per malattia cronica respiratoria. Nell'uomo *M. Elephantis* è da considerarsi un contaminante nell'escreato, al contrario è da valutarsi la sua patogenicità se riscontrato in altri materiali biologici.

M064

BATTERIEMIA PERSISTENTE DA *M. CHELONAE* IN UN PAZIENTE SOTTOPOSTO A TRAPIANTO DI POLMONE

Malighetti V., Grancini A., Ranzi M.L., Maraschini A., Perego L., Penati V.*, Caspani M.L.°

Lab. Centrale di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia

° Terapia Intensiva Generale - IRCCS Ospedale Maggiore - Milano;

* Lab. Microbiologia - Istituto Villa Marelli - Ospedale Niguarda - Milano;

Mycobacterium chelonae è un micobattere a rapida crescita che deve essere considerato un importante patogeno umano potendo causare infezioni sia cutanee che sistemiche.

Un uomo di 56 anni, sottoposto a trapianto di polmone sin. per grave enfisema bollosa bilaterale, in terapia immunosoppressiva con Ciclosporina (1,5 mg x 2), Azatioprina (50 mg x 2), Deltacortene (25 mg), viene ricoverato per l'assistenza post-operatoria presso il reparto di Terapia Intensiva dove manifesta grave insufficienza respiratoria, cardiocircolatoria e renale.

A 3 mesi dal trapianto, compaiono segni di probabile infezione in sede di cicatrice toracotomica in assenza di crescita di comuni agenti batterici. Il paziente manifesta rialzo termico (fino a 38° C) della durata di 24 ore. Vengono isolati da emocolture bastoncini Gram variabili alcool-acido resistenti

alla colorazione di Ziehl-Neelsen.

La febbre ricompare dopo 10 gg. e si isolano i medesimi microrganismi da altre 12 emocolture inviate nei successivi 30 giorni. Il Centro di riferimento per i Micobatteri Istituto Villa Marelli identifica il microrganismo come *M. chelonae* ad alto grado di resistenza; lo stesso microrganismo viene isolato da biopsia della cicatrice toracotomica.

Il paziente viene trattato con Amikacina (500 mg/48h circa secondo dosaggio ematico di valle) e Imipenem (500 mg x 2). Essendo migliorate le condizioni cliniche il paziente viene trasferito in Chirurgia e quindi in un centro riabilitativo con prescrizione di sole irrigazioni della ferita con fisiologica. Quando colture aerobiche e anaerobiche convenzionali di essudati da ferite suppurate, soprattutto in pazienti immunodepressi, risultano negative, i micobatteri devono essere considerati come possibili agenti eziologici.

M065

PCR REAL TIME PER L'IDENTIFICAZIONE DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MDR

Meacci F.; Orrù G.; Vicidomini S.; Trappetti C.; Oggioni M.R.; Pozzi G.

Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, viale Bracci, 53100 Siena.

La comparsa di ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* multi-drug-resistant (MDR-TB) pone l'accento sulla necessità di determinare la sensibilità ai farmaci degli isolati clinici, allo scopo di impostare un trattamento terapeutico efficace del paziente. I metodi tradizionali impiegati per saggiare la sensibilità ai farmaci dei micobatteri sono basati su tecniche colturali che, data la bassa velocità di crescita del microrganismo, hanno tempi di referatazione estremamente lunghi.

Obiettivi: Mettere a punto un saggio molecolare in grado di rilevare rapidamente le mutazioni più frequentemente associate alla resistenza verso i farmaci Isoniazide e Rifampicina in *Mycobacterium tuberculosis*.

Metodi: Sono state disegnate delle sonde Hybridization Probes (HP) per discriminare tramite PCR real time i codoni wild type da quelli mutati. Sono stati ottimizzati due diversi saggi di PCR, uno per il riconoscimento della resistenza all'Isoniazide uno per la resistenza alla Rifampicina. I geni target nei due saggi sono rispettivamente *katG* ed *rpoB*. Le sonde sono state disegnate sui codoni che sono risultati mutati nel corso di uno studio di epidemiologia molecolare, effettuato su isolati clinici italiani MDR-TB. Le sonde sono state validate su una collezione di 53 ceppi italiani MDR-TB.

Risultati: L'associazione di entrambe le reazioni di PCR ci ha consentito di identificare gli alleli resistenti nel 94,2% degli MDR-TB (49/53).

Conclusioni: La PCR real time basata sull'uso delle sonde HP è un metodo rapido e affidabile per effettuare un antibiogramma molecolare in ceppi MDR di *Mycobacterium tuberculosis*. La determinazione della sensibilità può essere effettuata sia su un campione positivo all'osservazione microscopica, sia su una coltura primaria positiva. Questo saggio molecolare permette di ottenere un'informazione preliminare ed essenziale circa la suscettibilità ai farmaci dell'isolato entro poche ore dal prelievo del campione, contro le 4-6 settimane necessarie per la determinazione colturale della farmaco resistenza.