

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.