

reni sono stati poi incubati per 18 ore a 37°C in ambiente arricchito col 10 % di CO₂. Gli streptococchi beta emolitici inibiti dalla Bacitracina, identificati come sierogruppo A, sono stati quindi saggiati su terreni semisolidi contenenti antibiotici secondo le modalità previste dalla ditta produttrice della galleria. Il nostro campione di studio è risultato costituito da 121 isolati per l'anno 2002 e da 43 isolati per l'anno 2003. La percentuale di sensibilità per la Penicillina è stata del 90 % per l'anno 2002 e del 88 % per l'anno in corso. La percentuale di sensibilità per Eritromicina è stata del 50 % per 2002 e del 38 % per il 2003. La percentuale per Levofloxacin è stata del 98 % per 2002 e del 97 % per il 2003. La percentuale di sensibilità per CAF è stata del 95 % per l'anno 2002 e del 94 % per l'anno in corso. Non si sono rilevate resistenze né per Cefotaxime né Vancomicina. Le conclusioni che possiamo trarre sono che, accanto a percentuali di sensibilità quasi invariate per alcuni farmaci, si assiste ad una riduzione per la famiglia dei Macrolidi di cui viene testata l'Eritromicina. L'andamento di tale andamento dovrà essere confermato da ulteriori dati.

M092

VALUTAZIONE DELLE RESISTENZE DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA URINOCOLTURE

Montella F., di Salvo R., Picillo G., Iovene M.R.

Dipartimento di Medicina Sperimentale
Sez. Microbiologia - Servizio di Batteriologia Clinica
Dir. Prof. M.A. Tufano
Seconda Università di Napoli - Via Pansini, 5

Introduzione

L'urinocoltura rappresenta l'esame più richiesto al Laboratorio di Batteriologia Clinica. È noto che l'80% delle infezioni nosocomiali del tratto urinario sono sostenute da batteri gram-negativi. La specie più frequentemente isolata è *Escherichia coli*.

Scopi

Gli obiettivi della ricerca sono stati: 1) valutare la sensibilità di ceppi appartenenti alla specie *E. coli* verso chemioantibiotici utilizzati nella terapia delle infezioni urinarie; 2) stimare le eventuali variazioni di sensibilità nel corso di 2 anni e 5 mesi di osservazione.

Metodologia

Da gennaio 2001 a Maggio 2003 sono stati isolati nel Laboratorio di Batteriologia Clinica della Seconda Università di Napoli 281 ceppi di *E. coli* da campioni di urine di pazienti di età compresa tra i 20 e 75 anni ricoverati presso le divisioni di Medicina Generale, Nefrologia, chirurgia generale e terapia intensiva.

I campioni sono stati inoculati in brodo eugonico (ALIFAX) e monitorati per 2 ore in apparecchio automatizzato "UROQUIK" (ALIFAX).

Tutte le urinocolture con carica microbica superiore a 100.000 UFC/mL sono state seminate su Agar Mac-Conkey, agar Sabouraud, Agar mannitolo + NaCl 5%, Columbia CNA agar, ed incubate a 37° per 24 ore.

L'identificazione biochimica e il saggio di sensibilità in vitro dei ceppi isolati sono stati effettuati rispettivamente con Card GNI+ e Card GNS 502 (Biomerieux). La lettura fotometrica delle card e la relativa interpretazione è stata eseguita con sistema automatizzato VITEK (Biomerieux). L'efficienza delle card è stata verificata con ceppo *E. coli* N° 35218.

Risultati La percentuale di resistenza dei 281 ceppi di *E. coli*, per i chemioantibiotici saggiati, è stata negli anni 2001,

2002 e 2003 (5 mesi) la seguente:

%	AK	AMC	AMP	ATM	KF	CTX	CAZ	CIP	FOS
2001	0	22	45	13	22	0	0	12	1
2002	0	21	49	3	18	0	0	10	6
2003	0	25	57	9	57	2	2	15	2
%	CN	IPM	NA	F	NOR	PRL	TIM	TOB	SXT
2001	9	0	18	4	12	29	17	4	25
2002	8	0	19	3	10	31	17	4	32
2003	7	0	18	2	16	49	20	2	38

Conclusione

La prevalenza di resistenza osservata nel corso dello studio è in accordo con i dati ARSS. La percentuale annua delle resistenze risulta invariata nel 2001 e 2002. Si apprezza un maggiore aumento di resistenza verso AMP, KF, e PRL nei primi 5 mesi del 2003. Tuttavia questo dato parziale necessita di una conferma nei rimanenti 7 mesi del 2003. La conoscenza dei pattern di sensibilità dei ceppi di *E. coli* in ambito regionale e l'uso dell'antibiotico terapia mirata, consentirebbe di ridurre le resistenze prodotte da un uso improprio della terapia chemioantibiotica.

M093

DETERMINAZIONE DI *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* SU LIQUIDO SEMINALE

Migali A., Latini L., Palma M., Silvestrini S., Rocchetti D., Quagliarini L.

Laboratorio Analisi dell'A.S.L. 4 Senigallia.

Le Clamidiose comprendono un gruppo di batteri, parassiti intra-cellulari obbligati, molto diffusi nel mondo animale. Sono batteri gram-negativi, immobili, che si moltiplicano nel citoplasma delle cellule infettate con caratteristico ciclo di sviluppo che le differenzia dagli altri batteri intra-cellulari. La sopravvivenza delle Clamidiose in ambiente intra-cellulare sembra dovuta alla capacità di inibire la fusione dei lisosomi con il vacuolo fagocitario che contiene il parassita al momento dell'ingresso nella cellula. Nella cellula infetta le Clamidiose provocano un parziale blocco delle sintesi molecolari ed in particolare del DNA, attraverso una competizione per il pool intra-cellulare dei precursori.

Il materiale genetico della *C. trachomatis* è composto di un cromosoma circolare di DNA a doppio filamento e da un plasmide criptico.

La *Chlamydia trachomatis* è un parassita pressoché esclusivo della specie umana dove provoca una notevole varietà di quadri morbosi. Nell'uomo l'infezione da *C. trachomatis* provoca uretrite e si riscontra anche epididimite e prostatite. La diagnosi d'infezione in atto può essere fatta con certezza solamente con la dimostrazione della *Chlamydia* su colture cellulari. Vengono d'altronde utilizzate altre tecniche che ne permettono una diagnosi più rapida ed agevole:

- tecniche immuno-enzimatiche (EIA o ELISA);
- immunofluorescenza diretta;
- diagnosi mediante PCR
- test di ibridazione di acido nucleico (Sonde DNA).

Il BD ProbeTec ET è un sistema diagnostico che utilizza la tecnologia in fase omogenea SDA (Strand Displacement Amplification) come metodo di amplificazione isoterma (52° C) ed il trasferimento di energia fluorescente ET (Fluorescent Energy Transfer) come metodo di rilevazione, per testare la presenza di agenti patogeni in campioni clinici attraverso il rispettivo contenuto genetico. I tests BDProbeTec ET si basano sull'amplificazione e rilevazione

di DNA bersaglio mediante primer di amplificazione ed una sonda di rilevazione marcata con un agente fluorescente. L'amplificazione isoterma sfrutta la capacità dell'enzima di restrizione (BsoBI) di tagliare un filamento del DNA bersaglio modificato in modo tale che la DNA-polimerasi da un lato sintetizzi un nuovo filamento di DNA e dall'altro sposti il filamento di DNA sintetizzato precedentemente.

Attraverso quattro primer specifici questo metodo è in grado di amplificare un definito filamento in modo esponenziale. Il rilevamento in tempo reale è possibile per la presenza di una sonda con strutturata a forcina e sequenza specifica per il DNA target alla quale sono collegati due fluorocromi (Fluorescina e Rodamina) e dove è presente la regione per il riconoscimento specifico dell'enzima di restrizione BsoBI.

Scopo

L'utilità del nostro lavoro è stata quella di indagare un metodo per la determinazione della *Chlamydia trachomatis* nel liquido seminale, a fronte di esperienze negative da noi avute con altre metodiche usate in precedenza e al fine di meglio rispondere alle sempre più rilevanti richieste di diagnosi provenienti da chi studia le possibili cause dell'infertilità maschile.

Materiali e Metodi

I campioni di liquido seminale usati per la determinazione della *Chlamydia trachomatis* ci sono pervenuti dai medici di medicina generale e dagli specialisti andrologi, sia per verificare se esistessero delle infezioni, sia per eseguire lo spermogramma. I campioni selezionati utilizzati per la sperimentazione sono stati 95; la precauzione che abbiamo preso è stata quella di verificare la presenza di leucociti (non superiore 40 mm/c).

La tecnica usata per la determinazione della *C. trachomatis* nel liquido seminale è stato il sistema BD ProbeTec ET della Becton Dickinson.

- Micropozzetti di priming che contengono i primers e la sonda rilevatrice specifica
- Micropozzetti di amplificazione che contengono gli enzimi (polimerasi ed endonucleasi) e i nucleotidi per la reazione di amplificazione
- Le sedute di amplificazione prevedono un controllo positivo per la verifica della correttezza della procedura e un controllo negativo per la verifica della contaminazione ambientale
- Il controllo dell'amplificazione AC serve ad identificare i campioni eventualmente contenenti inibitori dell'amplificazione che, se presenti, potrebbero impedire la rilevazione del DNA di *Chlamydia trachomatis*
- Si considerano positivi i risultati se l'indice MOTA CL > o uguale a 2000, con indice MOTA AC qualsiasi (l'indice MOTA è una misurazione usata per valutare l'entità del segnale in fluorescenza)
- Si considerano negativi se l'indice MOTA CL < 2000 e l'indice MOTA AC > 1000
- Si considerano indeterminati se l'indice MOTA CL < 2000 e l'indice MOTA AC < 1000.
- Lo strumento interpreta e referta automaticamente i campioni come positivi, negativi o indeterminati.

I prova:

Centrifugare il campione a 3000 giri per 30 min., senza sottoporre il liquido seminale ad alcun trattamento

Al termine della centrifugazione eliminare tutto il surnatante, perché un eccessivo residuo di campione potrebbe causare inibizione dell'amplificazione

- Aggiungere 2 ml di diluente e vortexare per 5 sec il campione
- Procedere a lisi per riscaldamento a 114° C per 30 min.
- Lasciare raffreddare il campione a temperatura ambiente per 15 min.
- Preparare la piastra di priming e quella di amplificazione e

con il pipettatore trasferire 150 ul di campione lisato nei micropozzetti di priming

- Incubare la piastra di priming per 20 minuti a T° ambiente
- Trasferire la piastra di priming nel termoblocco di priming e contemporaneamente la piastra di amplificazione nel termoblocco di amplificazione e incubare per 10 min
- Trasferire 100 ul di campione dai micropozzetti di priming a quelli di amplificazione
- Sigillare infine la piastra di amplificazione per impedire la fuoriuscita di ampliconi e trasferirla immediatamente nello strumento di amplificazione e rilevazione simultanea ed attendere, dopo un'ora, la stampa automatica dei risultati.

II prova

- Testare i campioni entro 4 - 6 giorni dalla raccolta
- Aggiungere 4 ml di tampone fosfato (ph 6,8) 0,1 molare al liquido seminale conservato a 2-8° C
- Centrifugare il campione a 3000 giri per 30 min
- Procedere come da punto 2 della prova I, in avanti.

III prova

Il tampone fosfato, a nostro parere, serve alla stabilizzazione del liquido seminale senza alterarne le caratteristiche chimico- fisiche.

- Aggiungere uguali quantità di tampone fosfato (ph 6.8) 0,1molare al liquido seminale in esame.
- Lasciare i campioni 30 min. a temperatura ambiente, prima di procedere alla loro centrifugazione,
- Centrifugare il campione a 3000 giri per 30 min,
- Procedere come da punto 2 della prova I, in avanti.

Risultati e Conclusioni

I risultati ottenuti sui campioni testati sono i seguenti:

Tabella 1 Quadro riassuntivo dei risultati dei tests

Determin.	N°campioni	Pos. %	Neg. %	Indetermin. %
		V.A.	V.A.	V.A.
I prova	95	0	11	84
II prova	95	0	42	53
III prova	95	2	92	1

La nostra ricerca è stata finalizzata alla possibilità di verificare la messa a punto della metodica sopra descritta con l'obiettivo di determinare la presenza della *Chlamydia trachomatis* nel liquido seminale.

Si è proceduto, inoltre, a verificare la massima sensibilità del metodo, introducendo il controllo positivo nel liquido seminale ed applicando la medesima procedura eseguita sul campione.

Con tale metodologia si dovrebbe stabilire la capacità del metodo di rilevare la presenza di *Chlamydia trachomatis* a cariche infettanti molto basse.

Altri elementi di riflessione che stiamo considerando concernono le ragioni per le quali la diluizione del campione con il tampone fosfato renda possibile l'amplificazione, per valutare eventuali altri tamponi che non alterino il campione e forniscano risultati validi.

In conclusione possiamo affermare che lo scopo prefissato, a nostro parere, di determinare la presenza della *Chlamydia trachomatis* nel liquido seminale ha dato risultati che soddisfano pienamente lo scopo prefissato.

Ringrazio per la collaborazione data i:

- dott.L.Latini (biologo), dott.M. Palma (biologo) e i tecnici, Sig.ra S.Silvestrini e il Sig. D.Rocchetti .
- il direttore del Laboratorio Analisi dell' A.S.L 4 Senigallia, dott. L. Quagliarini.

Responsabile della Microbiologia A.S.L. 4 Senigallia
dott. Antonio Migali