

biogramma è stato determinato in terreno solido secondo Kirby-Bauer. Sono stati impiegati dischetti di: Amikacina, Gentamicina, Aztreonam, Cefotaxime, Cefotaxidime, Cefepime, Imipenem, Meropenem, Piperacillina, Piperacillina-Tazobactam, Ciprofloxacina, Levofloxacina oltre a Cloramfenicolo e Trimetoprim-sulfà per *Stenotrophomonas maltophilia*. Gli aloni d'inibizione sono stati interpretati secondo le regole NCCLS.

Risultati e conclusioni

Per quanto riguarda *Ps.aeruginosa* 72x2 pannelli hanno fornito 141 ID corrette con un'accuratezza a livello di specie del 97.9% e una riproducibilità delle repliche pari al 95.7%. *St. maltophilia* 26x2 pannelli hanno fornito 50 ID corrette con un'accuratezza a livello di specie del 96.2% e una riproducibilità delle repliche pari al 92.3%.

Per *A. lwoffii* e *baumanii* 14x2 e 9x2 pannelli hanno fornito rispettivamente 24 e 17 corrette ID con la presenza di alcuni errori di ID a livello di specie, ma non di genere e riproducibilità delle repliche pari al 71.5 e 88.8%. Da considerare che gli errori più frequentemente riscontrati sono stati errori dovuti alla mancata identificazione del ceppo (7 su 242 pannelli)

Anche per i risultati relativi all'esecuzione dell'antibiogramma Phoenix ha dimostrato estrema accuratezza. Le repliche hanno evidenziato grande riproducibilità dei dati. Le rare discrepanze riscontrate rispetto Kirby-Bauer hanno interessato soltanto intervalli Sensibile-Intermedio o Intermedio-Resistente Eccezionali sono le discrepanze Sensibile-Resistente.

G060

RIVALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DI GARDNERELLA, TRICHOMONAS VAGINALIS E CANDIDA NELL'ESSUDATO VAGINALE CON SONDE MOLECOLARI

Casari E., Ferrario A., Cristiano A., Grazioli V.

Sezione di Microbiologia, "Istituto Clinico Humanitas", Via Manzoni 56, 20090 Rozzano, Milano

Introduzione: nell'etiologia delle vaginiti/vaginosi *Gardnerella vaginalis* (GV), *Candida* spp. (CS) e *Trichomonas vaginalis* (TV) sono i microrganismi chiamati più frequentemente in causa; le metodiche di laboratorio classicamente deputate alla loro ricerca (lettura del vetrino dell'essudato vaginale a fresco o dopo colorazione di Gram, coltura in terreni selettivi), oltre a dipendere dalla correttezza di esecuzione del prelievo, presentano, a fronte di un costo contenuto, lo svantaggio di produrre risultati troppo soggetti ad una valutazione soggettiva con tempi che possono arrivare alle 48 ore.

Da pochi anni è disponibile un kit (Affirm VPIII, Becton Dickinson and Company, Sparks, Md.) per la ricerca, mediante ibridazione diretta con sonde DNA specifiche, dei genomi di GV, CS e TV nell'essudato vaginale; la metodica, dotata di adeguata sensibilità analitica, è completata in 40 minuti.

Obiettivo: abbiamo deciso di rivalutare, utilizzando il kit Affirm VPIII, la prevalenza di GV, CS e TV nell'essudato vaginale delle donne che sono giunte alla nostra osservazione sia per sospetta vaginite che per screening routinario prefecondazione assistita.

Materiali e metodi Da gennaio 2002 ad aprile 2003 sono state studiate 2300 donne con età compresa fra i 14 e i 65 anni (650 candidate alla fecondazione assistita e 1655 con disturbi riferibili a vaginite/vaginosi).

Risultati

ETA'	Gardnerella	Trichomonas	Candida spp
>55 (n=110)	19,1%	0,0%	7,3%
55-45 (n=130)	33,8%	3,8%	16,1%
35-45 (n=530)	19,6%	0,4%	9,8%
25-35 (n=750)	20,4%	0,5%	12,1%
<25 (135)	25,9%	0,7%	18,5%
ETA'	Gardnerella	Trichomonas	Candida spp
35-45 (n=400)	19,3%	0,5%	9,0%
25-35 (n=250)	17,7%	1,1%	9,3%

Conclusioni

1) Per quanto riguarda i soggetti sintomatici, pur con i dovuti distinguo relativi all'area geografica di origine, i risultati, almeno per quanto riguarda GV e CA, sono in linea con quanto riportato dalla letteratura internazionale

Autore	Gardnerella	Trichomonas	Candida spp
Di Bartolomeo S	23,8%	2,4%	17,8%
Hong S	26%	4%	11%
Acikgoz ZC	13,8%	2,2%	26,8%

- 2) Viene confermato che GV è il più frequente, soprattutto nelle pazienti fra i 45 e i 55 anni
- 3) Non si evidenziano differenze fra la popolazione sintomatica e quella apparentemente asintomatica
- 4) Questi primi dati suggeriscono una rivalutazione del ruolo di questi agenti nella genesi delle vaginiti.

G061

TIPIZZAZIONE AUTOMATICA IS6110 DI M.TUBERCULOSIS MEDIANTE IL SISTEMA ROBOTIZZATO RIBOPRINTER®

Barreca P.M., Pittaluga F., Marchiaro G., Cirillo D.

Laboratorio di Microbiologia Clinica AO San Giovanni Battista, c.so Bramante 88, Torino

L'aumento dei casi di tubercolosi, l'insorgenza e la diffusione di ceppi di *M. tuberculosis* multiresistenti (MDR), hanno stimolato lo sviluppo di nuove tecniche di tipizzazione molecolare considerate importanti strumenti per la sorveglianza della malattia. L'analisi RFLP delle sequenze di inserzione IS6110 è considerata la tecnica "gold standard" per lo studio epidemiologico della tubercolosi. Nonostante l'elevato potere discriminante, questo metodo presenta lo svantaggio di possedere lunghi tempi di esecuzione e richiede esperienza nell'interpretazione dei patterns. Il RiboPrinter® è un sistema automatico sviluppato per la ribotipizzazione batterica in grado di effettuare anche analisi automatiche in Southern blot. Questo sistema è stato da noi utilizzato per la tipizzazione automatica IS6110 di *M. tuberculosis*. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la riproducibilità del sistema RiboPrinter® per la tipizzazione IS6110 automatizzata di *M. tuberculosis* paragonandolo ai sistemi di tipizzazione manuali.

Sono stati isolati e tipizzati 44 ceppi di *M. tuberculosis* mediante RFLP-IS6110 convenzionale e PFGE (seguendo i protocolli standard) e mediante RiboPrinter® RFLP-IS6110. Per l'analisi RFLP-IS6110 con RiboPrinter® le cellule sono state trattate con acetone e cloroformio/metanolo (2:1, vol / vol) e risospese meccanicamente in RiboPrinter buffer. L'analisi dei patterns è stata effettuata mediante il software Bionumerics 2.5 per la rivelazione dei clusters.

I risultati ottenuti, analizzati mediante il Software

Bionumerics 2.5, hanno evidenziato una riproducibilità del 100% presentando profili identici degli stessi isolati in esperimenti diversi. Sono stati identificati 18 fingerprints costituiti da 6-10 frammenti e dei 44 ceppi esaminati sono stati individuati 6 clusters. Questi risultati sono stati confermati da RFLP-IS6110 e da PFGE evidenziando un'identica sensibilità fra i tre metodi.

La tipizzazione automatica RFLP-IS6110 mediante RiboPrinter® è un metodo sicuro, riproducibile, di facile esecuzione per la tipizzazione dei ceppi di *M. tuberculosis* e può essere utilizzata per l'identificazione e il monitoraggio in tempi brevi delle epidemie.

G062

IDENTIFICAZIONE E RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI DI CEPPI BEN CARATTERIZZATI ANALIZZATI IN LABORATORI LIGURI

Lemmi M¹., Dho G., Manno G², e. Debbia E.A³ per AMCLI LIGURIA

Lab Analisi Ospedali Galliera, Laboratorio Ricerca e Diagnostica Infettivologica Di.Pe. Istituto G.Gaslini, Sez. Microbiologia DiSCAT, Università di Genova

Uno studio è stato attivato in Liguria per valutare lo stato dell'arte dei laboratori di microbiologia sull'identificazione e sull'accertamento di ben caratterizzate resistenze agli antibiotici.

A tal scopo, 26 ceppi oltre quelli ATCC per controllo, sono stati inviati ai laboratori pubblici e privati che ne avevano fatto richiesta. Solo 7/19 (36.8%) dei centri hanno analizzato tutti i ceppi inviati e 4/19 (21%) hanno eseguito i test su circa la metà dei ceppi. I sistemi più utilizzati sono stati il Vitek e l'Api/ATB. *Staphylococcus aureus* resistente all'oxacillina: il 24% dei test non hanno correttamente evidenziato la resistenza specialmente il ceppo mecA inducibile. *S.haemolyticus*, buona la percentuale delle identificazioni a livello di specie, la valutazione della sensibilità alla teicoplanina è stata elevata 63%. Enterococchi: l'identificazione a livello di specie non è stata brillante (35% non corrette), gli errori si sono concentrati in *E.faecium* e *E.gallinarum*; per la vancomicino-R invece l'85% dei lab che hanno eseguito il test hanno dato un risultato corretto. *S.pneumoniae*: la sensibilità a penicillina ed eritromicina è stata eseguita rispettivamente dal 43% e 36% dei laboratori, con solo il 2% di errori per il primo antibiotico, mentre per eritromicina l'incidenza è stata 7%. Il fenotipo di resistenza è stato riportato solo da 2 laboratori che hanno eseguito il test con la metodica del doppio dischetto. *S.pyogenes*: per il saggio della eritromicino-R valgono le stesse considerazioni di *S.pneumoniae*. ESBL: è alto il numero di risultati non corretti, pari al 47%.

In definitiva molti Laboratori risentono sia delle restrizioni finanziarie, sia del peso della routine che molto spesso condiziona l'esito del saggio. I ceppi inviati per lo studio sono piuttosto rari e quindi di difficile approccio, ma se non identificati correttamente possono dar luogo ad effetti devastanti. Questo studio che continuerà, porterà certamente grossi benefici a tutti i laboratori coinvolti.

G063

DIAGNOSI DI LABORATORIO DI BORRELIOSI, LEPTOSIROSIS E SIFILIDE MEDIANTE METODI MOLECOLARI AVANZATI

Calderaro A., Piccolo G., Bommezzadri S., Incaprera M., Zuelli C., Guégan R., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università di Parma, Viale Gramsci 14, 43100 Parma.

Introduzione. Indagini molecolari avanzate si stanno dimostrando sempre più utili nella diagnosi di infezione da microrganismi patogeni di interesse medico, quando opportunamente affiancate a quelle tradizionali, dirette (microscopia e coltura) e indirette (sierologia). Al fine di migliorare sensibilità, specificità ed efficacia dei saggi per la diagnosi di laboratorio di infezione da spirochete patogene è stato deciso di introdurre nel nostro laboratorio, reazioni di PCR per la rivelazione del DNA di *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Leptospira spp.* e *Treponema pallidum*, rispettivamente.

Materiali e metodi. Sono state ampiamente valutate sensibilità, specificità ed efficacia dei tre saggi seguenti: il primo (nested-PCR in singolo tubo) allestito in casa per amplificare un frammento genico di *Borrelia burgdorferi sensu lato*; il secondo (nested-PCR "16SrRNA") allestito in casa per amplificare un frammento genico di *Leptospira spp.*; il terzo (nested-PCR "Treponema pallidum <bmp>", Amplimedical S.p.A.) saggio commerciale per amplificare un frammento del gene "bmp" che codifica per una proteina di membrana del batterio.

Risultati e conclusioni. I saggi di PCR si sono tutti rivelati altamente sensibili, specifici ed efficaci. Il saggio nested-PCR in un singolo tubo potrà essere applicato sia nella diagnosi di laboratorio rapida di malattia di Lyme al fianco delle procedure tradizionali come l'esame colturale, lungo e indaginoso, e l'esame sierologico, poco sensibile e poco specifico, sia per escludere l'infezione in casi di sospetta borreliosi. Il saggio "16SrRNA" è risultato essere un efficace strumento diagnostico da applicare alla diagnosi di laboratorio di leptosirosi, specialmente durante i primi giorni dell'infezione quando altri saggi diagnostici risultano poco sensibili e poco specifici. Infine, il saggio "Treponema pallidum <bmp>", data l'impossibilità di coltivare il batterio *in vitro*, può assumere un ruolo fondamentale nella diagnosi dei casi di lue nei quali le indagini sierologiche sono di dubbia interpretazione o non applicabili, sia per escludere l'infezione in casi sospetti.