

STUDIO EPIDEMIOLOGICO DELLE INFEZIONI ASSOCIATE A CATETERISMO VASCOLARE NELL'ANNO 2000 E I SEMESTRE 2001

Pascarella M., Battistetti G., Trinca M., Morello V. e Piaserico G.
 Laboratorio Analisi Chimico cliniche e Microbiologia,
 Presidio Ospedaliero di Montebelluna, ULSS n°8 Asolo (TV)

INTRODUZIONE

L'utilizzo di cateteri intravascolari rappresenta una pratica sempre più diffusa, in ambiente ospedaliero, soprattutto per esigenze diagnostico-terapeutiche in particolari servizi e reparti.

Sono stati studiati gli isolamenti microbiologici delle punte di catetere venoso centrale (CVC) pervenute in Laboratorio, con particolare attenzione al reparto di provenienza e alla sensibilità antibiotica dei microrganismi in causa. Il nostro studio s'inserisce nel programma di controllo delle infezioni ospedaliere del nostro presidio ospedaliero.

MATERIALI E METODI

Sono state esaminate 294 punte di catetere venoso centrale nell'anno 2000 e 75 nel I semestre 2001, per un totale di 369.

La punta di CVC è stata sottoposta all'esame batteriologico secondo la tecnica di Cleri.

RISULTATI

Sono risultate positive in totale di 76 punte di CVC (20,5 %), la distribuzione per reparto è riportata nella tabella n°1

	ANNO 2000	I SEMESTRE 2001
Rianimazione	19 (70)	2 (22)
Chirurgia	23 (101)	6 (28)
Altri reparti chirurgici	13 (16)	0 (5)
Altri reparti	10 (107)	3 (20)
TOTALI	65 (294)	11 (75)

I microrganismi isolati sono riportati nella tabella n°2

	ANNO 2000	I SEMESTRE
Stafilococco aureo	19	3
Stafilococchi coagulasi negativi	34	5
Candida spp.	4	1
Enterococchi	4	0
Gram negativi	10	2

La meticillina resistenza è stata rilevata in 15 ceppi di stafilococco aureo e in 18 stafilococchi coagulasi negativi.

CONCLUSIONI

Il nostro studio si inserisce nell'ambito di un progetto di controllo delle infezioni associate a cateterismo vascolare. Il progetto, in corso da numerosi anni, ha previsto, nelle sue fasi realizzative, la formazione del Personale, la stesura di linee guida per la gestione dei cateteri, la sorveglianza microbiologica delle punte rimosse, il report puntuale dei dati ottenuti.

E' ormai noto come il ricorso a tali interventi diagnostico-terapeutici cruenti, indispensabili per la gestione del paziente, sia causa di rischi elevati di complicanze infettive locali e sistemiche, per cui è opportuno monitorare l'uso di tali tecniche attraverso una cooperazione costante tra Reparto, Direzione Medica e Laboratorio Microbiologico.

DESCRIZIONE DI ALCUNI CASI DI ANISAKIDOSI NEL PESCARESE

P. Fazii¹, G. Riva², L. Cosentino¹, G. Riario Sforza¹

¹Laboratorio Analisi P.O. "Spirito Santo", Pescara; ²Laboratorio Lofarma S.p.A., Milano

Scopo del lavoro

Lo scopo del nostro lavoro è stato dimostrare che, una parassitosi quale l' Anisakidosi (A.) (causata dall'ingestione di prodotti ittici crudi infestati da larve vive di parassiti anisakidi, prevalentemente appartenenti al genere *Anisakis*), ritenuta rara in Italia, in realtà è verosimilmente sottostimata in quanto misconosciuta nelle sue varie manifestazioni cliniche che simulano alcune patologie gastrointestinali.

Materiali e Metodi

Alcuni pazienti residenti nel comprensorio di Pescara, abituali mangiatori di pesce crudo o poco cotto, ricoverati presso il nostro nosocomio per sintomi gastrointestinali, sono stati studiati per la presenza, a livello sierico, di anticorpi anti-*Anisakis*. È stata eseguita la ricerca sia degli anticorpi di tipo IgG che di tipo IgE (rispettivamente mediante le metodiche ELISA e RIA). Nella presente casistica abbiamo considerato un gruppo di 10 pazienti sottoposti ad intervento chirurgico o a biopsia, con presenza di segni istologici suggestivi di A. (presenza del nematode e/o di infiltrato eosinofilo). Non è stato invece incluso un gruppo di 9 pazienti ricoverati per sintomi e segni radiologici suggestivi di A., che hanno egualmente presentato anticorpi anti-*Anisakis*, ma che non sono stati sottoposti ad intervento chirurgico o ad esame istologico. Tutte le determinazioni anticorpali sono state eseguite, dall'ottobre 1998 al luglio 2001, presso il Laboratorio Lofarma di Milano.

Risultati

	Età	sex	patologia sospetta al momento del ricovero	*livello delle IgG anti- <i>Anisakis</i>	classe di positività delle IgE anti- <i>Anisakis</i> (da classe 0 a classe 4)
Caso N° 1	41	M	morbo di Crohn	elevato	3
Caso N° 2	35	F	occlusione intestinale	**medio	**2
Caso N° 3	30	F	appendicite acuta	elevato	3
Caso N° 4	64	M	neoplasia intestinale	** medio	**3
Caso N° 5	53	M	neoplasia intestinale	elevato	4
Caso N° 6	30	M	ileite terminale	elevato	4
Caso N° 7	19	F	appendicite acuta	elevato	4
Caso N° 8	11	F	rettocolite ulcerosa	elevato	3
Caso N° 9	38	M	morbo di Crohn	elevato	4
Caso N° 10	57	F	gastrite cronica	elevato	3

*I risultati sono espressi come rapporto positivo/negativo e classificati in 4 livelli (I: non rilevabile o basso; II: medio; III: elevato; IV: molto elevato). **Titoli anticorpali testati mesi dopo l'episodio di A.

Discussione e Conclusioni

Dai dati desunti dalla letteratura, risultano altri 8 casi di A. diagnosticati in Italia. Si è trattato di soggetti residenti in zone di mare della Sicilia (3 casi), delle Puglie (4 casi) e della Liguria (1 caso). A parte questi casi conclamati, nel nostro Paese, vi sono state, soprattutto negli anni cinquanta, diverse segnalazioni di granulomi eosinofili del tratto gastrointestinale che potrebbero essere stati causati da infestazioni di anisakidi. In conclusione, riteniamo che, da quanto osservato nella zona di Pescara e contrariamente a quanto viene ritenuto nel nostro Paese, l' A. possa essere ritenuta una parassitosi non particolarmente rara, in quanto probabilmente misconosciuta e, di conseguenza, sottostimata.

RICERCHE SULLA PRESENZA DI *Ixodes ricinus* NEL BELLUNESE

G. Bertiato, G. Benedetti, C. Doglioni, C. Lorenzato, G. Piccolin, L. Pitton, M. Ramon, S. Mancuso

Osservatorio per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche
U.L.S.S. n° 1 di Belluno

Dalla prima segnalazione di un caso di borreliosi di Lyme nel 1989, le infezioni trasmesse da zecche costituiscono nel Bellunese un importante problema sanitario e sociale. La probabilità di contrarre questa malattia è in relazione con la distribuzione e l'abbondanza di zecche, in particolare di *Ixodes ricinus*, considerato il vettore di diversi microrganismi (primo fra questi *Borrelia burgdorferi*) verso l'uomo e verso molte specie di mammiferi domestici e selvatici.

Scopo del lavoro. Nel corso dell'anno 2000, prima fase di attuazione di un progetto interregionale di cooperazione Veneto-Carinzia, l'Osservatorio per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche, istituito dall'U.L.S.S. n°1, ha condotto una campagna di raccolta dei parassiti in alcune aree a vocazione turistica del Bellunese. Ciò come indagine preliminare ad un più ampio monitoraggio che permetta, utilizzando un sistema geografico informatizzato (GIS), di tracciare le mappe di rischio di contatto con i parassiti trasmettitori e la presenza in essi degli agenti patogeni.

Materiali e Metodi. Per la raccolta delle zecche sono stati scelti 15 siti, distribuiti in tre comuni di rilevante frequentazione antropica a carattere lavorativo e turistico nell'Agordino. Le stazioni, individuate in base alla cartografia dell'I.G.M. (1:25.000), sono state distribuite secondo l'altitudine: 7 sotto i 700 m, 6 tra 700 e 800, e 2 sopra gli 800. Il profilo ecologico di ciascun sito è stato rilevato in riferimento all'esposizione rispetto ai punti cardinali, al tipo e alla densità della vegetazione, alla vicinanza a corsi d'acqua e alla presenza di fauna.

Complessivamente sono stati effettuati 6 campionamenti, confinati nei mesi di marzo, maggio, giugno, luglio, agosto, settembre, in rapporto al periodo di attività delle zecche. In tale operazione è stato utilizzato il metodo della "coperta strisciata" (*dragging sample*), strisciata sul terreno per 5', esprimendo il numero di esemplari rinvenuti come individui/minuto di strisciata.

Detta raccolta è stata eseguita dal personale del Corpo Forestale dello Stato - Sezione di Belluno, che ha registrato su apposita scheda le condizioni climatiche relative a ciascun campionamento.

Le zecche, immerse immediatamente in alcool al 70%, conservate a +4°C, venivano trasportate al Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e di Microbiologia dell'Ospedale "San Martino" di Belluno.

Risultati. Sono stati raccolti 951 esemplari di *Ixodes ricinus* di cui 70 nel primo campionamento, 52 nel secondo, 120 nel terzo, 163 nel quarto, 355 nel quinto, 191 nel sesto. Complessivamente si sono individuate 515 larve (54%), 395 ninfe (42%) e 41 adulti, 28 maschi e 13 femmine.

In tutte le stazioni, la presenza di *Ixodes* è stata osservata in almeno uno dei campionamenti e con andamento dell'infestazione estremamente variabile.

Lo stadio larvale è stato dimostrato solo nei campioni prelevati a partire dal mese di giugno, divenendo lo stadio prevalente in agosto e settembre.

La numerosità delle zecche è risultata legata prevalentemente alla vegetazione di densità medio-bassa.

Conclusioni. I dati esposti, in linea con il ciclo vitale tipico di *Ixodes ricinus*, indicano che le zecche sono presenti in tutti i siti considerati, con una netta prevalenza delle larve. Costante nei mesi è la presenza degli adulti e delle ninfe, quest'ultimo stadio è quello considerato più aggressivo per l'uomo. In rapporto alla zona di campionamento, la numerosità dei parassiti varia in dipendenza di fattori non sempre controllabili.

Progetto - Cooperazione interregionale Veneto-Carinzia per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche - DGRV n° 3739/99 cod."AVEN222057" - cofinanziato dall'Unione Europea fondo FEOGA nell'ambito del Programma Operativo INTERREG II Italia-Austria.

COMPRESENZA DI *Ehrlichia* (HGE) E *Borrelia burgdorferi* IN *Ixodes ricinus* NEL BELLUNESE**G. Bertiato, G. Benedetti, C. Doglioni, C. Lorenzato, G. Piccolin, L. Pitton, S. Mancuso***Osservatorio per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche
U.L.S.S. n° 1 di Belluno*

L'ehrlichiosi è stata descritta nell'uomo per la prima volta nel 1987 e il primo caso in Europa, accertato solo su base clinica e sierologica, è stato riportato nel 1991. Successive ricerche sierologiche condotte in Svizzera e Inghilterra hanno dimostrato la presenza di anticorpi anti-*Ehrlichia phagocytophila* nel 5-7% di soggetti punti da zecche. In Slovenia sono stati recentemente riportati casi di ehrlichiosi granulocitica umana (HGE). Come vettori sono stati identificati *Rhipicephalus sanguineus* per *E. canis* e *Ixodes ricinus* per *E. phagocytophila* e poco si conosce sugli animali serbatoi e sull'ecologia delle ehrlichie in Europa. Si suppone, tuttavia, sulla base della compresenza in sieri umani di anticorpi anti-ehrlichia e anti-borrelia, che in alcune zecche possano essere compresenti sia *B. burgdorferi* che *Ehrlichia*. Negli Stati Uniti la distribuzione di HGE di solito coincide con quella della Malattia di Lyme in aree in cui vi è presenza di zecche. In Italia infezioni da *Ehrlichia* sono state descritte in cani e cavalli, ma non è stato documentato alcun caso clinico di HGE.

Scopo del lavoro. Nel corso dell'anno 2000, prima fase di attuazione di un progetto interregionale di cooperazione Veneto-Carinzia, l'Osservatorio per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche, istituito dall'U.L.S.S. n°1, ha condotto una campagna di raccolta dei parassiti in alcune aree del Bellunese. Ciò come indagine preliminare ad un più ampio monitoraggio che permetta, utilizzando un sistema geografico informatizzato (GIS), di tracciare delle mappe di rischio di contatto con i parassiti trasmettitori e la presenza in essi degli agenti patogeni.

Materiali e metodi. Sono state esaminate 951 zecche: 515 larve (54%), 395 ninfe (42%), 41 adulti, 28 maschi e 13 femmine, ottenute da sei campionamenti ripetuti tra marzo e settembre su quindici stazioni individuate nell'Agordino. Per la raccolta è stato utilizzato il metodo della "coperta strisciata" (*dragging sample*). Le zecche venivano raccolte e conservate in alcool etilico al 70% a 4°C. Gli estratti di DNA, ottenuti con il metodo del fenolo/cloroformio per gli adulti, e con il metodo di Schoultz per ninfe e larve, vennero amplificati con i primer 16a/16b specifici per il DNA mitocondriale di *Ixodes*, come controllo della fase di estrazione (Matuschka, 1996), con i primer c/c' specifici per *B. burgdorferi sensu lato* (Rosa, 1991), e con i primer Ehr521/Ehr747 capaci di amplificare una regione variabile della sequenza del gene 16S rRNA di *E. equi*, *E. phagocytophila* e HGE (Pancholi, 1995).

Risultati. L'indagine ha consentito di individuare 84 esemplari positivi per *B. burgdorferi sensu lato*, 81 ninfe e 3 maschi, e 31 esemplari positivi per *Ehrlichia*, 30 ninfe e 1 femmina. Merita di essere sottolineato che in sette campioni di DNA (0,74%) è stata registrata la contemporanea positività per *Ehrlichia* e per *Borrelia burgdorferi*.

Conclusioni. La compresenza di *B. burgdorferi* e di *Ehrlichia* in *Ixodes ricinus* è stata segnalata la prima volta in Italia nel 1997 in zecche raccolte in una zona del Lazio (Cinco et al.). I dati suesposti suggeriscono l'opportunità di approfondire gli studi clinici e laboratoristici tenendo presente la possibilità succitata di coinfezione da *Borrelia* e da *Ehrlichia*.

Progetto - Cooperazione interregionale Veneto-Carinzia per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche - DGRV n° 3739/99 cod."AVEN222057" - cofinanziato dall'Unione Europea fondo FEOPA nell'ambito del Programma Operativo INTERREG II Italia-Austria.

PRESENZA DI *Ehrlichia* (HGE) IN *Ixodes ricinus* NEL BELLUNESE**G. Bertiato, G. Benedetti, C. Doglioni, C. Lorenzato, G. Piccolin, L. Pitton, S. Mancuso***Osservatorio per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche U.L.S.S. n°1 di Belluno*

Le ehrlichie, batteri intracellulari obbligati, dimostrabili in monociti e macrofagi, granulociti o piastrine sono responsabili di una malattia febbrile sistemica nell'uomo e in alcuni animali selvatici e domestici. Vengono trasmesse da alcune specie di zecche che si infettano su ospiti intermedi selvatici. La prima osservazione risale al 1987. Alcuni casi di ehrlichiosi nell'uomo, malattia oggi ritenuta una zoonosi emergente, sono stati osservati in alcune aree europee note con endemia di borreliosi. Nell'uomo l'ehrlichiosi monocitica (HME) è causata da *E. chaffeensis*, e l'ehrlichiosi granulocitica (HGE) è causata da ehrlichie correlate a *E. equi* e a *E. phagocytophila*.

Scopo del lavoro. Nell'ambito di un progetto interregionale di cooperazione Veneto-Carinzia, l'Osservatorio per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche, istituito dall'U.L.S.S. n°1, ha condotto nel corso dell'anno 2000 una campagna di raccolta dei parassiti in alcune aree del Bellunese. Ciò come indagine preliminare ad un più ampio monitoraggio che permetta, anche attraverso l'utilizzo di un sistema geografico informatizzato (GIS), di tracciare le mappe di rischio di contatto con i parassiti trasmettitori e la presenza in essi degli agenti patogeni.

Materiali e Metodi. Sono state esaminate 951 zecche: 515 larve (54%), 395 ninfe (42%), 41 adulti, 28 maschi e 13 femmine, ottenute da sei campionamenti ripetuti tra marzo e settembre su quindici stazioni individuate nell'Agordino. Per la raccolta è stato utilizzato il metodo della "coperta strisciata" (*dragging sample*). Le zecche venivano raccolte e conservate in alcool etilico al 70% a 4°C. Gli estratti di DNA, ottenuti con il metodo del fenolo/cloroformio per gli adulti, e con il metodo di Schoultz per ninfe e larve, vennero amplificati con i *primer 16a/16b* specifici per il DNA mitocondriale di *Ixodes*, come controllo della fase di estrazione (*Matuschka, 1996*), e con i *primer Ehr521/Ehr747* capaci di amplificare una regione variabile della sequenza del gene 16S rRNA di *E. equi*, *E. phagocytophila* e HGE (*Pancholi, 1995*).

Risultati. L'indagine ha consentito di individuare 31 esemplari positivi per *Ehrlichia*, 30 ninfe e 1 femmina. Il 3,26% delle zecche in esame sono risultate positive, appartenendo queste quasi totalmente allo stadio di ninfa, nel cui ambito la positività risultava del 7,59%.

Conclusioni. Le aree in cui abbiamo dimostrato la positività per *Ehrlichia* in *Ixodes ricinus* raccolti nella Provincia di Belluno sono le stesse già note per la presenza di *Borrelia burgdorferi* e TBEV. In Europa la prevalenza in *I. ricinus* di batteri del genogruppo *E. phagocytophila* è segnalata dello 0,8% negli adulti in Svizzera (Pusterla et al., 1998) e del 3,2 % in Slovenia (Petrovec et al., 1999), del 3,1 e del 9,2 nelle ninfe della costa Est ed Ovest della Svezia (Von Stedingk et al., 1997). In un'area del centro Italia è stata riportata una prevalenza del 24,4% nelle ninfe (Cinco et al., 1997).

Progetto - Cooperazione interregionale Veneto-Carinzia per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche - DGRV n° 3739/99 cod."AVEN222057" - cofinanziato dall'Unione Europea fondo FEOGA nell'ambito del Programma Operativo INTERREG II Italia-Austria.

INDAGINI SULLA PRESENZA DI *Borrelia burgdorferi* IN *Ixodes ricinus* NEL BELLUNESE**G. Bertiato, G. Benedetti, C. Doglioni, C. Lorenzato, G. Piccolin, L. Pitton, M. Ramon, S. Mancuso***Osservatorio per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche**U.L.S.S. n° 1 di Belluno*

Le infezioni trasmesse da zecche si presentano nella provincia di Belluno con sempre maggior evidenza così da costituire un rilevante problema sanitario e sociale sia per la popolazione residente sia per i flussi turistici che interessano la zona.

Scopo del lavoro. Nel corso dell'anno 2000, prima fase di attuazione di un progetto interregionale di cooperazione Veneto-Carinzia, l'Osservatorio per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche, istituito dall'U.L.S.S. n°1, ha condotto una campagna di raccolta dei parassiti in alcune aree a vocazione turistica del Bellunese. Ciò come indagine preliminare ad un più ampio monitoraggio che permetta, utilizzando un sistema geografico informatizzato (GIS), di tracciare le mappe di rischio di contatto con i parassiti trasmettitori e la presenza in essi degli agenti patogeni.

Materiali e Metodi. La ricerca delle borrelie è stata condotta, con tecniche di biologia molecolare, sulle 951 zecche provenienti da sei campionamenti mensili effettuati, tra marzo e settembre, in 15 stazioni nell'Agordino. Tutti i parassiti (posti in alcool etilico al 70% e conservati a 4°C) appartenevano alla specie *Ixodes ricinus*: 515 larve (54%), 395 ninfe (42%) e 41 adulti, 28 maschi e 13 femmine. Da ciascuna zecca è stato estratto il DNA presente con il metodo del fenolo/cloroformio per gli adulti e con il metodo di Schoultz per ninfe e larve. Successivamente si è proceduto all'amplificazione utilizzando i primer 16a/16b specifici per il DNA mitocondriale di *Ixodes*, come controllo della fase di estrazione (Matuschka, 1996), e con i primer c/c' specifici per *B. burgdorferi sensu lato* (Rosa, 1991). Per l'analisi genotipica dei campioni positivi sono stati utilizzati i primer MC16, MC25 e MC33 che riconoscono sequenze plasmidiche rispettivamente di *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* e *B. garinii* (Misonne, 1998).

Risultati. L'indagine ha consentito di individuare 84 esemplari positivi per *B. burgdorferi sensu lato*, 81 ninfe e 3 maschi. L'8,8% delle zecche in esame è risultato positivo, appartenendo queste quasi totalmente allo stadio di ninfa, nel cui ambito la positività risultava del 20,5%.

Il genotipo di appartenenza delle borrelie è risultato così distribuito: 22 *B. garinii* (26,2%), 17 *B. afzelii* (20,2%), 6 *B. burgdorferi sensu stricto*. In un caso è stata rilevata la compresenza di *B. afzelii* e *B. burgdorferi sensu stricto*. Negli altri campioni non è stato possibile dimostrare le tre genospecie considerate patogene per l'uomo.

Conclusioni. In Europa la prevalenza di *Borrelia* in *Ixodes ricinus* è risultata del 23% in Belgio (Misonne et al., 1998), dal 10 al 30% in alcune regioni della Russia (Alekseev et al., 1998), dal 19 al 55% in Finlandia (Juntilla et al., 1999), del 21,8% nel Sud della Germania (Baumgarten et al., 1999), dal 9,7 al 47,5 in Svizzera (Péter et al., 1995), dal 4 al 23% in Slovenia (Strle et al., 1997). In Italia sono state riportate prevalenze fino al 38% in alcune zone del Carso triestino (Cinco et al., 1997) e del 16,5% delle ninfe in Trentino (Rizzoli et al., 2000).

I genotipi da noi dimostrati rientrano nella norma dell'epidemiologia europea. Per quanto attiene ai ceppi non classificabili pensiamo di dover approfondire l'analisi sia per la ricerca di nuove genospecie (come *B. bissettii*, isolata da pazienti con M.di Lyme nella vicina Slovenia, o *B. valaisiana*) sia di borrelie, associate ad artropodi e mammiferi, per le quali non è stata ancora accertata la patogenicità per l'uomo.

Progetto - Cooperazione interregionale Veneto-Carinzia per lo studio, la sorveglianza e la prevenzione delle infezioni trasmesse da zecche - DGRV n° 3739/99 cod."AVEN222057" - cofinanziato dall'Unione Europea fondo FEOGA nell'ambito del Programma Operativo INTERREG II Italia-Austria.

GESTIONE DEI PAZIENTI ONCOLOGICI PORTATORI DI CATETERI LONG TIME TRAMITE L'ESECUZIONE DI EMOCOLTURE

- * Falleni M., Leonetti P., Costanzo S., Bartolini P., Ragusa E., Bartolino T., Innocenti B..
- * 1° Lab. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche Azienda Ospedaliera Pisana

Obiettivo

Al fine di contribuire a formulare una diagnosi in pazienti con probabile batteriemia da contaminazione del CVC, abbiamo stabilito di seguire un particolare percorso nella esecuzione delle emocolture valutando il tempo differenziale di positivizzazione delle emocolture prelevate contemporaneamente da CVC e da sangue periferico, come viene suggerito dallo studio di Blot e collaboratori in Francia. Considerando che nelle batteriemie da CVC si verifica una contaminazione del lume del catetere, la coltura del sangue proveniente da questa sede avrà cariche batteriche superiori ad analoghe aliquote prelevate da sede periferica e quindi, tempi di crescita più rapidi.

Materiali e metodi

Il tempo di positivizzazione delle emocolture è un dato che viene automaticamente fornito dal sistema BACTEC 9240 della Becton Dickinson presente nel nostro laboratorio. I campioni di emocoltura risultati positivi sono stati seminati in comuni terreni disposti in piastre di Petri e i batteri sviluppati sono stati identificati con il Sistema Vitek2 bio Merieux.

Risultati

Durante un periodo di cinque mesi, settembre 2000 – gennaio 2001, sono state inviate al Laboratorio 1041 emocolture per un totale di 2082 flaconi (Aerobi e Anaerobi)

Di queste, 36 erano provenienti dal reparto di Oncologia Medica e relative a 5 pazienti.

Per i prelievi relativi a tre pazienti (24 campioni complessivi) si è osservata una positivizzazione più rapida delle emocolture prelevate da CVC rispetto alle altre con differenze di tempi variabili tra le due e le cinque ore. Per un paziente l'esito è stato completamente negativo (6 campioni) e per il quinto non si sono rilevate differenze nei tempi di sviluppo (6 campioni). Dalle porzioni terminali di CVC estratti dai quattro pazienti in oggetto, sono stati isolati ed identificati gli stessi germi presenti nelle relative emocolture. La sintomatologia correlata alla sepsi è scomparsa nei quattro pazienti entro 48 ore dalla rimozione del CVC.

Conclusioni

I dati in nostro possesso sono sicuramente esigui, ma offrono lo spunto per alcune importanti riflessioni.

Il tempo di positivizzazione delle emocolture è un dato che tutti gli strumenti automatici forniscono ma spesso è trascurato o ignorato. Inserire la valutazione dei tempi differenziali di positivizzazione può contribuire con uno sforzo minimo del Laboratorio alla formulazione di diagnosi in pazienti severamente impegnati e a proporre le impostazioni terapeutiche del caso. Si intravede la possibilità di applicare questo metodo di indagine anche a pazienti portatori di CVC short time. E' conduzione indispensabile nella conduzione di uno studio con queste caratteristiche di creare o rafforzare le sinergie tra il Laboratorio e i Reparti afferenti. Questo studio ci ha stimolati nella ricerca di nuove e migliori forme di comunicazione con gli utenti del nostro Servizio e ha imposto modifiche funzionali alla organizzazione interna del Laboratorio di Microbiologia.

SU DI UN CASO DI ENTERITE DA *Vibrio cholerae* NON AGGLUTINABILE (NAG) DOPO UN SOGGIORNO IN TUNISIA

C. Zasio, M. Battistel, G. Del Giudice, C. Granata °, E. Modolo, N. Papa, A. Rota, R. Schiavon, G. Bertiato

Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche e di Microbiologia, Ospedale "San Martino", Belluno
°Malattie Infettive, Ospedale "San Martino", Belluno

Il colera, classicamente descritto come enterite con diarrea gravemente debilitante o fatale, è causato da ceppi di *Vibrio cholerae* dei sierogruppi O1 e O139. Ceppi che non agglutinano gli antisieri anti-O1 e anti-O139 (*V. cholerae* non agglutinanti NAG) continuano ad essere ritenuti di scarsa importanza in patologia umana, e sono associati a malattia solo in una bassa percentuale di pazienti ospedalizzati a causa di episodi acuti di enterite. Diarrea, crampi addominali, e febbre sono i sintomi predominanti, con vomito e nausea nel 25% dei casi.

Caso clinico

Nell'estate 2001 venne ricoverata nel reparto di Malattie Infettive del nostro Ospedale una giovane di 23 anni con enterite febbrile. La paziente era di ritorno da un soggiorno turistico di una settimana in Tunisia. Durante la permanenza all'estero aveva consumato del pesce cotto, verdure crude e bevande alle quali era stato aggiunto del ghiaccio prodotto localmente. I sintomi, diarrea, con crampi addominali e febbre elevata (39°C), erano insorti al rientro in Italia.

Materiali e metodi

Sulle feci l'esame microscopico diretto evidenziava la presenza di numerosi leucociti e di batteri incurvati, estremamente mobili. Negativa la ricerca parassiti. Per la coprocultura vennero utilizzati terreni in piastra selettivi e differenziali per la ricerca di *Salmonella* e *Shigella* (Hektoen Enteric agar, Rambach agar), *Yersinia*, *Campylobacter*, *E. coli* 0157 e, visto il sospetto clinico, la coltura in acqua peptonata alcalina, con semina diretta in TCBS. Dalle colonie sospette furono avviate le prove identificative su gallerie Sceptor BD e Api BioMerieux, e le agglutinazioni con antisieri specifici Biogenetics.

Risultati

Le prove colturali hanno portato all'isolamento dalle feci di un ceppo di *Vibrio cholerae* non agglutinante NAG e di una salmonella minore. L'identificazione venne confermata a Treviso presso il Centro Enterobatteri del Veneto. La terapia con fluorochinoloni tempestivamente instaurata ha consentito la rapida remissione dei sintomi. I controlli successivi, a quadro clinico risolto, indicarono la scomparsa del vibrione, mentre la coprocultura rimase positiva per salmonella anche a distanza di una settimana.

Conclusioni

La maggior parte dei laboratori in Italia non eseguono di screening la ricerca dei vibriani. In caso di colera diventa importante conoscere bene i dati anamnestici ed il sospetto clinico, le tecniche da seguire per la coltura e l'identificazione di questi microrganismi e, in caso di infezioni gravi, per l'antibiogramma, tenuto conto dell'emergere di ceppi resistenti.

L'enorme aumento dei viaggi intercontinentali propiziati da un intenso turismo di massa ed i flussi migratori verso la nostra area geografica sono alla base di un notevole allargamento della diffusione di malattie che fino a pochi anni fa venivano ritenute esotiche e sulle quali deve essere attirata l'attenzione di quanti sono interessati ai problemi della sanità pubblica. Al di là della consistenza clinica delle infezioni provocate da tipi di microrganismi a bassa patogenicità resta importante l'isolamento di ceppi interessanti a livello di marcatori epidemologici.

Caso di sepsi meningococcica non associato a meningite: diagnosi rapida su materiale da lesione emorragica cutanea.

A. Pupillo, P. Gualdi, M. Schinella, *N. Fioroni, *A. Petrone

*Laboratorio Analisi chimico-cliniche e Microbiologia; * U.O. Pediatria, Ospedale S.Maria del Carmine – P.le S.Maria 6, 38068 Rovereto (TN)*

INTRODUZIONE

La *Neisseria meningitidis* colonizza comunemente il nasofaringe di soggetti sani e i portatori umani costituiscono il maggior serbatoio di questo agente eziologico; si calcola che la percentuale di portatori meningococcici vari dal 4 a 25%. Il contagio avviene direttamente attraverso le secrezioni respiratorie o le goccioline di Flügge. In una piccola percentuale di soggetti colonizzati il microrganismo può diffondere dal nasofaringe nel circolo sanguigno producendo una batteriemia transitoria o una sepsi, con o senza una concomitante meningite. La letalità nei casi con meningite è valutata intorno al 2-10%, mentre la sepsi senza meningite ha una letalità stimata intorno al 20-30% e forse superiore. L'incidenza della malattia è maggiore nei bambini di età compresa tra 6 mesi e 5 anni. Segni prognostici sfavorevoli comprendono l'assenza di meningite, l'ipotensione, la precoce comparsa di petecchie, l'iperpiressia, l'assenza di leucocitosi e la trombocitopenia.

CASO CLINICO

Si riferisce il caso di un bambino di 3 anni giunto in Pronto Soccorso, e successivamente trasferito presso l'Unità Operativa di Pediatria del nostro Ospedale, con iperpiressia (40°C) dal giorno precedente e manifestazioni emorragiche (petecchie, ecchimosi ed escare) diffuse in tutto il corpo.

In presenza di esami di laboratorio alterati: globuli bianchi $18.5 \times 10^3/\mu\text{l}$, piastrine $139 \times 10^3/\mu\text{l}$, PCR 26 mg/dl, INR 1.9, aPTT Ratio 1.31, fibrinogeno 740 mg/dl e D-dimero $> 10000 \text{ ng/ml}$, per il sospetto clinico di malattia meningococcica, veniva eseguita rachicentesi, prelievo per emocoltura e una scarificazione delle petecchie con spremitura e raccolta su vetrino del materiale ottenuto.

MATERIALI E METODI

I preparati ottenuti per scarificazione delle petecchie sono stati colorati in un primo momento con arancio di acridina ed osservati al microscopico a fluorescenza dove sono stati evidenziati rari diplococchi, a chicco di caffè che, alla successiva colorazione al Gram, sono risultati Gram negativi consentendo così la diagnosi di sepsi meningococcica.

L'esame chimico-fisico del liquor è risultato negativo, come anche la ricerca degli antigeni batterici e l'esame colturale.

L'emocoltura invece si è positivizzata dopo circa 18 ore di incubazione a 37°C; al vetrino eseguito dal flacone sono stati evidenziati diplococchi Gram negativi e la ricerca di antigeni batterici è risultata positiva per *N.meningitidis*. Dalle sottocolture eseguite in agar sangue, agar cioccolato e Thayer Martin, incubate a 37°C in microaerofilia al 5% di CO₂ per 24 ore, sono state isolate colonie di 1 mm di diametro, grigiastre, luccicanti e mucoidi, ossidasi positive. La colorazione di Gram evidenziava diplococchi Gram negativi e l'identificazione biochimica, eseguita con gallerie ApiNH (bioMerieux) ha dato come risultato *N.meningitidis*. La tipizzazione sierologica eseguita con antisieri polivalenti Difco ha dato positività per il gruppo *a, b, c, d*; il ceppo è stato inviato all'Istituto Superiore di Sanità per la definitiva tipizzazione. L'antibiogramma eseguito su Mueller Hinton agar con E-test ha dato risultati di sensibilità alle molecole saggiate con le seguenti MIC: penicillina 0,047 µg/ml, cefotaxime 0,004 µg/ml, cloramfenicolo 0,75 µg/ml e rifampicina 0,047 µg/ml.

CONCLUSIONI

La sepsi meningococcica può comportarsi come un'infezione a decorso rapido, che richiede un intervento immediato. La colorazione di Gram del materiale ottenuto per scarificazione delle petecchie può, come nel nostro caso, permettere di identificare tempestivamente l'agente patogeno consentendo di iniziare sia una terapia mirata per il paziente, che una profilassi per le persone che hanno avuto contatti con il malato e pertanto esposte ad un alto rischio di contrarre la malattia.

METICILLINO-RESISTENZA DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUL TERRITORIO: UN PROBLEMA EMERGENTE

A.Camporese*, G.Tizianel*, P.Cappelletti**

*Unità di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica

**Dipartimento di Medicina di Laboratorio

Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli" - Pordenone

Negli ultimi anni, mentre si è dato grande rilievo all'incremento delle resistenze in ambiente ospedaliero, si sono talora sottostimati i sempre più frequenti allarmi provenienti dalla popolazione territoriale, soprattutto per quanto concerne i pazienti affetti da patologie croniche, spesso ripetutamente trattati con antibiotici e soggetti a frequenti ricoveri ospedalieri (una recente indagine della Regione F.V.G. ha rilevato il 22% di riammissioni in Ospedale di questi soggetti entro 60 gg. dall'ultimo ricovero). I microrganismi che si isolano da questi pazienti extra-ospedalieri presentano sempre più spesso caratteristiche di resistenza tipicamente nosocomiali e sono responsabili non solo di infezioni croniche e/o recidivanti difficilmente risolvibili, ma anche della progressiva colonizzazione della comunità, rappresentando altresì un importante *reservoir* per successive re-introduzioni di resistenze in ambito ospedaliero.

Sulla scorta di nostre precedenti analoghe segnalazioni, abbiamo inteso valutare in un periodo di tempo di tre anni e mezzo (da gennaio 1998 a giugno 2001) l'incidenza di isolamenti di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) nella realtà territoriale della provincia di Pordenone. Sono stati presi in considerazione tutti i materiali biologici, ottenuti da diverse sedi (ferite, pus, urine, essudati) in pazienti ambulatoriali con patologie acute e croniche e in soggetti sintomatici domiciliati presso case di riposo.

Isolamento e identificazione sono stati eseguiti con i consueti metodi di routine, mentre la valutazione della suscettibilità agli antibiotici e la resistenza all'oxacillina sono stati effettuati con il metodo di Bauer & Kirby, secondo quanto previsto dalle raccomandazioni dell'NCCLS. Il controllo di qualità interno è stato eseguito ogni settimana utilizzando il ceppo di *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, secondo i parametri dell'NCCLS. Durante il periodo considerato, sono stati isolati 423 ceppi di MRSA: 93 nel 1998, 117 nel 1999, 149 nel 2000 e 64 nel primo semestre del 2001. Dall'indagine è emerso che nei ceppi isolati dal territorio il livello di meticillino-resistenza è andato progressivamente aumentando dal 1998 a oggi: infatti, mentre nel 1998 la refrattarietà alla meticillina, espressione della resistenza a tutti i beta lattamici, era del 9.7%, nel 1999 è passata al 18.1%, nel 2000 al 20.5% e nel primo semestre del 2001 si è attestata al 24.8%. Tra l'altro, molti ceppi di MRSA presentano una refrattarietà estesa anche a diverse altre molecole, quali ad esempio i macrolidi e i fluorochinoloni, creando non pochi problemi di gestione terapeutica delle infezioni. Contrariamente a quanto è stato evidenziato sul territorio, a livello nosocomiale nello stesso periodo di tempo si è invece raggiunto un livello pressoché stabile di meticillino-resistenza: 29.7% nel 1998, 34.7% nel 1999, 36.1% nel 2000 e 36% nel 2001, mentre in I.C.U., reparto-sentinella notoriamente ad elevato rischio di infezioni da MRSA, il livello di refrattarietà all'oxacillina è andato crescendo esponenzialmente fino al 2000, per poi ridursi a seguito di diversi interventi mirati di prevenzione: 59.6% nel 1998, 73.1% nel 1999, 87.4% nel 2000 e 67% nel 2001.

Come risulta evidente da questi dati, la meticillino-resistenza, da problema squisitamente nosocomiale, sta progressivamente estendendosi al territorio, creando prospettive di difficile gestione e di sempre più probabile trasmissione crociata della resistenza tra ospedale e comunità. Gli MRSA isolati da pazienti territoriali non solo costituiscono ormai dei veri e propri patogeni emergenti nella realtà extra-ospedaliera, ma rappresentano un potenziale e pericoloso *reservoir* che richiede attente misure di sorveglianza per evitare la progressiva colonizzazione della comunità e l'estendersi del fenomeno della multi-resistenza degli stafilococchi a diverse molecole antimicrobiche. Uno dei dati di particolare interesse quale importante fattore di rischio per contrarre un'infezione da MRSA sembra essere rappresentato dai precedenti ricoveri ospedalieri e dalla precoce domiciliatura extra-ospedaliera dei pazienti cronici: la maggiore incidenza di isolamenti di MRSA territoriali proviene, infatti, da pazienti con patologie croniche che hanno subito almeno un ricovero ospedaliero per poi essere trasferiti a casa o essere domiciliati presso strutture protette o case di riposo.

Diversi motivi ci inducono a pensare che questi soggetti costituiscano oggi un importante e crescente fattore di rischio per l'estensione dentro e fuori l'ospedale delle resistenze batteriche in genere e, in particolare, del fenomeno della meticillino-resistenza.

Questi dati, confermati da analoghe recenti segnalazioni in letteratura, ci inducono a considerare nuovi scenari per il trattamento antibiotico domiciliare rispetto al passato, nonché a una maggiore sorveglianza e una nuova politica di prevenzione e di formazione degli operatori sul territorio.

Valutazione della resistenza agli antibiotici nella cura del piede diabetico: studio di due anni in una foot clinic.

Piazza A.*, Pagano M. A.*, Faella R.*, Romagnolo R*, Bax G.°, Masin M.°, Fedele D.°

* Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Geriatrico, ULSS 16, Padova

° Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Servizio di Diabetologia, Ospedale Geriatrico, Università di Padova

Introduzione. La resistenza ai farmaci antimicrobici è un problema sanitario emergente degli ultimi anni, sia dal punto di vista clinico sia da quello della spesa sanitaria. Un attento controllo delle resistenze sviluppate dai vari ceppi batterici presenti nelle ulcere del piede diabetico è di fondamentale importanza per una puntuale ed efficace terapia dei casi più severi.

Scopo del lavoro. Valutazione delle percentuali di resistenza agli antibiotici più comunemente utilizzati nei confronti dei ceppi isolati con maggior frequenza da ulcere di piede diabetico nel biennio 1999-2000, evidenziando eventuali variazioni nel periodo citato.

Materiali e metodi. Sono stati valutati i tamponi da ulcere di pazienti affetti da diabete di tipo 2 di età media 68 ± 10 afferenti all'ambulatorio del piede per ulcere trofiche nel biennio 1999-2000. La semina dei materiali e l'isolamento dei germi è stato effettuato su piastre Becton-Dickinson, l'antibiogramma sullo strumento VITEK della ditta bioMérieux.

Risultati. I germi isolati nel 1999 sono stati 60, nel 2000 101. Le percentuali di tali germi, nonché le percentuali di resistenza nei confronti dei farmaci antimicrobici più comunemente utilizzati nella pratica ambulatoriale nella terapia del piede diabetico sono riportate in tabella.

Ceppi batterici	% di isolamento		% di resistenza											
			TMP-SMX		Ciprofloxacina		Gentamicina		Eritromicina		Vancomicina/ Teicoplanina		Imipenem	
	1999	2000	1999	2000	1999	2000	1999	2000	1999	2000	1999	2000	1999	2000
<i>Enterobacteriaceae</i>	30	24	28	8	6	12	6	24					0	8
<i>P. aeruginosa</i>	16	11			40	18	30	27					10	18
<i>Staph. aureus</i>	31	32	16	12	42	30	42	30	42	27	0	0		
<i>Staph. epidermidis</i>	10	15	33	27	17	47	67	47	40	33	0	0		

Discussione e conclusioni. Confrontando le annate 1999 e 2000, non si evidenziano particolari variazioni nella percentuale di isolamento dei vari ceppi. Risulta invece evidente come le Enterobacteriaceae e i ceppi di *S. epidermidis* nel periodo considerato abbiano sensibilmente sviluppato resistenza nei confronti della famiglia dei chinolonici, spesso utilizzati come farmaci di prima scelta nella pratica ambulatoriale per la cura del piede diabetico. Altresì evidente è la resistenza di nuova insorgenza da parte delle Enterobacteriaceae e l'incremento della stessa da parte di *P. aeruginosa* nei confronti dell'imipenem. D'altro canto sembra che sia in tendenziale diminuzione la resistenza verso farmaci considerati meno potenti, come nel caso delle Enterobacteriaceae nei confronti del trimetoprim-sulfametossazolo e degli *S. aureus* ed *epidermidis* verso l'eritromicina.

La selezione di ceppi batterici resistenti ad antibiotici di recente introduzione nella pratica clinica (come chinolonici e imipenem) e considerati più potenti impongono quindi particolare cautela nella scelta di tali farmaci, per poter intraprendere un trattamento mirato e quindi efficace per risolvere l'infezione e salvare l'arto. A tale scopo, tenendo presente le indicazioni del laboratorio microbiologico, si può iniziare una terapia con farmaci meno recenti ma verso i quali i germi dimostrano una buona sensibilità.

EVIDENCE BASED MEDICINE E RICERCA DI HBV-DNA NEL MONITORAGGIO DI PAZIENTI HBsAG POSITIVI

D. Bassetti^a, C. Paternoster^b, N. Dorigoni^b, M.F. Guglielmino^a, D. D'Achille^a, F. Branz^b, P. Caciagli^a.

^a Patologia Clinica II: Microbiologia Immunologia, Ospedale S. Chiara, Trento

^b Malattie Infettive, Ospedale S. Chiara, Trento

Scopo del lavoro

L'infezione da virus dell'epatite B rappresenta nonostante l'introduzione del vaccino uno dei maggiori problemi clinico-terapeutici della virologia medica a causa del grande numero di portatori presenti nel mondo (oltre 300 milioni) e della gravità delle complicanze dell'epatite stessa. Lo sviluppo delle tecniche di trapianto epatico e le recenti acquisizioni in tema di terapia, come l'utilizzo della lamivudina e del famciclovir, rendono indispensabile il monitoraggio dell'infezione con tecniche sempre più sensibili e specifiche. Scopo del presente lavoro è la verifica di utilità della ricerca di HBV-DNA nei pazienti stessi.

Materiali e Metodi

Sono stati esaminati 46 pazienti (32 M e 14 F) afferenti al servizio di Malattie Infettive dell'Ospedale S. Chiara di Trento, costituiti da: 5 soggetti con epatite in fase acuta, 40 con epatopatia B cronica, dei quali 32 con variante HBeAg negativi (variante e-minus) e 6 in terapia con lamivudina. Un caso era relativo ad una paziente con riscontro occasionale di HBsAg/HBeAg positività senza indici di citolisi. In detti pazienti, presso il Laboratorio di Microbiologia Immunologia di Trento, è stata eseguita la ricerca quantitativa di HBV-DNA mediante un test di ibridazione molecolare con sonda a RNA in micropiastra con amplificazione lineare del segnale e rivelazione automatica in chemiluminescenza (Hybrid Capture II System HBV-DNA test, ABBOTT).

Risultati

Il test, presentante una sensibilità pari a 140000 copie/ml pari a 0.5 pg/ml ed un range dinamico di 140000-2x10⁻⁹ copie/ml, ha fornito risultati positivi in 15 pazienti, negativi in 29, dubbi in 2. Segnatamente i 5 pazienti in fase acuta erano tutti positivi, compreso un paziente risultato negativo alla ricerca HBsAg, il che ha consentito l'individuazione di una probabile variante escape di HBV. Nei pazienti con epatite cronica si evidenziavano 12 positività, mentre il caso di HBsAg/HBeAg positività isolata era HBV-DNA negativo.

Discussione e Conclusioni

La ricerca di HBV-DNA risulta indispensabile nella valutazione delle epatopatie croniche da virus B, soprattutto nella variante e-minus, al fine di programmare una terapia con lamivudina, anche ai sensi di recenti disposti legislativi. La successiva determinazione quantitativa consente, accanto agli indici di citolisi, un accurato monitoraggio terapeutico. In fase diagnostica la ricerca di HBV-DNA permette l'identificazione di portatori sani HBsAg, l'individuazione di falsi positivi o falsi negativi. In base a tali dati e considerato il costo della determinazione, presso l'APSS di Trento sono in via di allestimento idonee e specifiche Linee Guida al fine di ottimizzare risorse e risultati.

DIAGNOSI SIEROLOGICA DI INFEZIONE DA EPSTEIN BARR VIRUS CON SISTEMA IMMUNOENZIMATICO AUTOMATIZZATO

P. Martelli, R. De Luca, M.L. Modolo, M.Crovatto, L. Mucignat, D. Corazza, C. Donadoni, V. Carnelutto, D.Villalta, P.Cappelletti.

Dipartimento Medicina di Laboratorio, U. O. Microbiologia - Immunologia, A.O. PORDENONE

Scopo del lavoro

Valutazione di un sistema immunoenzimatico automatizzato per la determinazione di IgG e IgM verso un pannello di antigeni ricombinanti (EA D, EBNA -1, VCA) per la diagnosi di infezione da EBV.

Materiali e Metodi

Campioni: 73 campioni di siero di sieroteca da 71 soggetti così caratterizzati (sulla base di dati clinici, anamnestici e sierologici):

- A 20 sieri da 20 infezioni in fasi acute , 2 da un'infezione in fase precoce di convalescenza
- B 9 sieri da 9 soggetti con infezione pregressa
- C 9 sieri da 9 soggetti sieronegativi per EBV
- D 16 sieri da soggetti con ANA (12) o WR/FR (4) positivi
- E 17 da 16 soggetti con infezione da : HCV (4); Toxoplasma gondii (4), Rubella (2) e CMV (3) in fase acuta IgM positive ; con sospetta riattivazione da CMV IgM positiva (3).

Materiali : Tutti campioni sono stati testati con i kit immunoenzimatici EBV VCA IgG e IgM, EBV EA D IgG e IGM, EBNA 1 IgG e IgM e l' EIA automated processor MAGO PLUS DIAMEDIX Florida) , utilizzando per l'esecuzione e l'interpretazione dei risultati le indicazioni fornite dai produttori stessi. La caratterizzazione dei campioni per quanto riguarda EBV è stata eseguita mediante immunofluorescenza EBV VCA G e M, EBNA G, EA D+R della MRL California.

Risultati

P	VCA G			VCA M			EA G			EA M			EBNA G			EBNA M			tot
	+	-	?	+	-	?	+	-	?	+	-	?	+	-	?	+	-	?	
A	10	12	0	20	2	0	7	9	6	16	2	4	2	19	1	17	2	3	22
B	9	0	0	1	8	0	1	7	1	2	6	1	8	1	0	1	7	1	9
C	0	9	0	0	9	0	1	7	1	0	8	1	0	9	0	0	9	0	9
D	14	2	0	1	13	2	5	5	0	4	9	2	14	2	0	0	13	0	°16
E	17	0	0	5	12	0	2	15	0	7	8	2	17	0	0	2	14	0	17

°Alcuni campioni non sono stati testati per tutti i parametri.

Discussione e conclusioni

Reattività considerate come indice di possibile infezione acuta in atto o di possibile riattivazione (IgM anti EBNA, EA, VCA ed IgG anti EA) sono state riscontrate al di fuori dei casi di infezione primaria, in particolare nei sieri con fattori potenzialmente interferenti (gruppo D,E) ma non solo. L'esame del pattern anticorpale completo , nel caso dei campioni selezionati in esame, ha comunque consentito di distinguere agevolmente le forme acute dalle pregresse. In particolare IgM anti VCA positive (con o meno IgG anti VCA) associate ad EBNA IgG costantemente negative sono state riscontrate, come è corretto che sia, solo nel caso di infezioni acute. I due sieri da infezione primaria EBNA G positivo provenivano infatti dal paziente in fase precoce di convalescenza. Il sistema quindi pur avendo fornito su campioni altamente selezionati risultati che denunciano la possibilità di reazioni aspecifiche, ha permesso di classificare correttamente gli stessi a patto di valutare con cautela il pannello anticorpale completo. La nostra esperienza suggerisce che qualora si evidenzino quadri sierologici non chiari e si sospettino possibili reattività aspecifiche è opportuno escludere possibile patologia di altra natura.

E' POSSIBILE RIDURRE IL TAT PER LA DIAGNOSI DELLA MALATTIA TUBERCOLARE? METODICHE A CONFRONTO

A.Rulli, M.Odoriso, A.Gambi, B.DeLaurentiis, S.Troiano, E. Marrone, G. Mantini, S. Martinotti. Laboratorio di Patologia Clinica II
Ospedale Clinicizzato SS. Annunziata Chieti

SCOPO DEL LAVORO

Nella nostra realtà ospedaliera affluisce un numero abbastanza elevato di pazienti con tubercolosi sia dal reparto di pneumologia che di tisiologia oltre che pazienti HIV+ ed immunocompromessi con sospetto di tubercolosi provenienti da reparti diversi. Pertanto il laboratorio di microbiologia si è posto come obiettivo l'affiancamento di metodiche in PCR alla metodologia tradizionale nella diagnosi di TBC. Scopo del lavoro è stato di confrontare le metodologie già in uso nel nostro laboratorio con quelle di nuova introduzione per verificare se sarà possibile immettere in routine i test di biologia molecolare con conseguente riduzione del TAT.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati in totale 40 campioni di cui 9 provenienti dalla clinica malattie infettive, 9 dalla pneumotisiologia, 10 da pneumologia, 3 da medicina generale, 5 da rianimazione e terapia intensiva cardiocirurgica, 2 da chirurgia generale e 2 ambulatoriali. La tipologia dei campioni analizzati è stata molto eterogenea comprendendo materiale di provenienza polmonare (espettorato, lavaggi bronchiali e liquidi pleurici), urinario e cutaneo.

Il criterio di selezione è stato:

- campioni il cui esame microscopico diretto era positivo per bacilli alcool-acido resistenti ;
- campioni il cui esame colturale era risultato positivo per micobatteri;
- campioni risultati negativi ai due punti precedenti ma sospetti clinicamente perché provenienti dalla tisiologia.

Le metodiche tradizionali utilizzate sono state:

- esame colturale su terreni solidi: IUTM e Lowenstein Jensen
- esame colturale su terreni liquidi (Bactec - Ditta BD)

le metodiche in biologia molecolare sono state:

- Gene probe della ditta Biomerieux
- Probetec della ditta BD

I campioni sono stati decontaminati con NaOH.

Il sistema di coltura automatizzata Bactec 9000/FMB utilizza un terreno liquido rilevando lo sviluppo di micobatteri sulla base dell'emissione di fluorescenza in seguito alla diminuzione di ossigeno contenuto nel flacone. Il test Geneprobe rivela rRNA del Mycobacterium tuberculosis complex mediante sonde di DNA specifico a singolo filamento. Il test BD Probetec ET rivela DNA del micobatterium tuberculosis complex mediante primer di amplificazione ed una sonda di rivelazione marcata con un'agente fluorescente.

RISULTATI

Come si può osservare nella tabella 1, si è avuta una concordanza tra le metodiche per 32 campioni pari al 80 %.

N° CAMP	IUTM/LOW	BACTEC	GENEPROBE	PROBETEC	Microscopia
22	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
10	POS	POS	POS	POS	POS
2	POS	POS	NEG	POS	POS
2	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
2	NEG	NEG	POS	POS	POS
2	NEG	POS	NEG	NEG	NEG

Tab. 1: corrispondenza dei risultati nei vari campioni analizzati con le diverse metodiche utilizzate per lo screening

I due campioni negativi al geneprobe e positivi agli altri test appartenevano a pazienti con tubercolosi I due pazienti positivi al geneprobe e negativi agli altri tests sono stati dimessi con diagnosi di micobatteriosi atipica, da confermare attraverso tipizzazione molecolare delle specie non tubercolari tramite PCR.

I due pazienti con test di biologia molecolare positiva ed esami colturali negativi erano trattati con farmaci antitubercolari al momento del prelievo; l'esame colturale negativo va considerato un segno prognostico favorevole. Per i due pazienti con solo esame colturale positivo non è stato confermato clinicamente il sospetto di TBC.

CONCLUSIONI

I test di biologia molecolare di ultima generazione testati hanno dimostrato una buona sensibilità e specificità e una buona concordanza con i test colturali tradizionali sia intervenendo nell'analisi del trascritto che del DNA del micorganismo.

Inoltre i test sopra citati hanno il vantaggio rispetto alle procedure tradizionali di accorciare notevolmente il TAT.

Con l'abbattimento dei costi, in un immediato futuro, le metodiche di biologia molecolare potranno diventare determinanti per una veloce e accurata diagnosi di malattia tubercolare.

DIAGNOSTICA DELLE INFEZIONI DELLE VIE URINARIE: SINERGIA TRA TECNOLOGIE

Dott. Patrizio Caciagli, dott.ssa Iole Caola

Laboratorio Patologia Clinica II, Trento

Introduzione

Al Laboratorio di Microbiologia nell'Ospedale S.Chiera di Trento (980 posti letto con un bacino di riferimento di 185.000 persone, di cui 2300 in età pediatrica) afferiscono annualmente 25.000 urine per esame colturale, delle quali il 20% appartenenti a pazienti pediatrici.

E' stato percepito nel contesto di un corso di aggiornamento il bisogno da parte dei pediatri del territorio di avere una risposta rapida ed affidabile nel sospetto di infezione delle vie urinarie (IVU).

Per rispondere a tale bisogno, è stata condotta un' indagine di mercato per ricercare metodi alternativi al sistema classico dell'urinocoltura. Abbiamo individuato due apparecchiature, il luminometro *Coral Wave* ed il citofluorimetro *UF100* che, gestiti da un software dedicato e collegato ad host computer, costituiscono un sistema analitico in grado di effettuare un conteggio di leucociti, marcatore di flogosi delle vie urinarie, e di batteri ed una misura dell'ATP batterico, quale conferma di vitalità dei microrganismi nel campione urinario.

Materiali e metodi

Sono stati confrontati i risultati ottenuti con la coltura tradizionale in piastra del campione di urina (gold standard) e quelli dal sistema analitico integrato "Leucocituria e Batteriuria con UF100 e Coral"; per quest'ultimo sono stati fissati limiti prudenziali di negatività per ciascun parametro considerato (fino a 15 leucociti/microl., 5000 batteri su UF100 e assenza di ATP batterico con cut-off 2% rispetto al calibratore per Coral).

In caso di superamento dei valori limite anche di uno solo dei parametri sopraelencati il campione è stato incluso nella categoria dei "positivi" allo screening.

Risultati

Sono stati esaminati 736 campioni di urina di pazienti adulti e pediatrici (79% ambulatoriali e 21% da degenti ospedalieri) dei quali il 25% hanno mostrato una crescita batterica significativa (secondo i criteri dell'ASM).

Il sistema integrato ha dimostrato, rispetto alla coltura eseguita in contemporanea sullo stesso campione di urina, una sensibilità del 99%, una specificità del 68%, un valore predittivo negativo del 99,7%, con il solo 0,1% di campioni falsi negativi.

Conclusioni

Dai dati sopra esposti si evince la caratteristica di affidabilità del sistema nell'escludere una infezione urinaria in atto con una notevole riduzione del tempo di risposta (dalle 24 alle 6 ore). La disponibilità del dato già nelle prime ore del pomeriggio ed il miglioramento della qualità della risposta arricchita dal parametro leucociti, migliora sia l'efficienza che l'efficacia del dato di laboratorio. In particolare in ambito pediatrico, fornisce al clinico elementi probanti od escludenti un'infezione urinaria in tempi rapidi clinicamente utili.