

148

ANALISI DI CEPPI DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLATI DA PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Pulcrano G.¹, Lambiase A.¹, Roscetto E.¹, Raia V.²,
Del Pezzo M.¹, Rossano F.¹

¹Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano";
Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università di Napoli "Federico II".

²Dip. di Pediatria; Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università di Napoli "Federico II".

Pseudomonas aeruginosa (PA) è un microrganismo gram-negativo ambientale, responsabile di infezioni in soggetti affetti da fibrosi cistica (FC). In questi pazienti, il microrganismo acquisito casualmente dall'ambiente, presenta inizialmente una chemiosensibilità variabile e un fenotipo non mucidico; tuttavia, dopo diversi trattamenti terapeutici appaiono varianti multi-resistenti con fenotipo mucoso. I ceppi evidenziano anche una spiccata capacità di formare biofilm e, in particolare, il gene *pilA*, coinvolto nella biosintesi del pilo e nei meccanismi di quorum-sensing, è indispensabile alla formazione del biofilm.

In questo lavoro sono stati confrontati ceppi di PA isolati con frequenza trimestrale dagli espettorati di pazienti FC colonizzati cronicamente. I ceppi sono stati identificati e sottoposti a test di chemiosensibilità. Le relazioni clonali fra gli isolati sono state stabilite mediante PFGE, dopo digestione con *SpeI*.

La caratterizzazione molecolare dei ceppi in analisi ha evidenziato che, i pazienti del Centro di Fibrosi Cistica del Policlinico "Federico II" sono colonizzati da ceppi di PA non correlati tra loro. Dati precedenti avevano evidenziato che ceppi differenti di PA erano comunque caratterizzati da geni *pilA* dello stesso gruppo. L'attenzione è stata quindi focalizzata su tre ceppi caratterizzati da geni *pilA* e profili di antibiotico-sensibilità differenti. Da un punto di vista fenotipico due di questi ceppi si presentano mucoidi, mentre il terzo assume fenotipo mucoso dopo alcuni isolamenti. L'analisi del gene *pilA*, però, mostra solo in un caso la presenza di un gene coinvolto nella glicosilazione del pilo. L'analisi mediante PFGE ha dimostrato che due di questi pazienti sono cronicamente colonizzati con isolati appartenenti allo stesso "lineage", mentre il terzo ceppo aveva subito mutazioni nel profilo di restrizione.

L'infezione in pazienti FC da parte di microrganismi multi-antibiotico resistenti è un importante aspetto da monitorare e la caratterizzazione molecolare è in grado di dare importanti informazioni riguardanti lo "stato" del ceppo e la sua diffusione.

149

ASPETTI MICROBIOLOGICI DELLA FIBROSI CISTICA NELL' ESPERIENZA DI BERGAMO: PERIODO 2003 - 2007.

Raglio A., Arosio M., Grigis A., Vailati F., Passera M., Goglio A.

USC Microbiologia e Virologia, A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo.

Obiettivo. Lo scopo del presente lavoro è descrivere le caratteristiche microbiologiche dei microrganismi isolati dai pazienti affetti da Fibrosi Cistica e, nella realtà di un laboratorio ospedaliero di Microbiologia, la performance e le indicazioni alla identificazione dei metodi fenotipici tradizionali e del più recente sequenziamento del genoma batterico.

Metodi. Nella nostra routine diagnostica le metodiche adottate prevedono la colorazione al Gram, le caratteristiche di crescita e le indagini biochimiche manuali e/o automatizzate (gallerie API - VITEK 2, *bioMerieux*). L'esame molecolare è stato effettuato utilizzando il kit MicroSeq 500 (*Applied Biosystems*), eseguendo la fase di estrazione, amplificazione tramite PCR e sequenziamento del gene 16S rRNA, in accordo alle indicazioni della ditta. Per l'identificazione delle sequenze è stato utilizzato il database di GenBank (BLAST).

Risultati. Sono stati esaminati 37 pazienti, età compresa tra 1-30 anni, dei quali 15 sono stati sottoposti a trapianto polmonare. I campioni esaminati sono stati complessivamente 495 ed in particolare 428 respiratori (86.5%), 46 secrezioni purulente e 21 liquidi. Di questi oltre il 95% sono risultati positivi. In tutti i pazienti sono stati isolati microrganismi conosciuti come patogeni nella Fibrosi Cistica: *P. aeruginosa* 25 (49%), *S. maltophilia* 5 (9.8%), *B. cepacia* 3 (5.9%), *A. xylosoxidans* 5 (9.8%), *S. aureus* 5 (9.8%), *S. marcescens* 1 (2%) e *Aspergillus* spp. 7 (13.7%). Si è giunti ad una identificazione degli isolati con i metodi tradizionali in 33 casi (64.7%), nei rimanenti 18 (35.3%) che presentavano difficoltà interpretative (caratteristiche morfologiche e/o biochimiche) si è proceduto ad una identificazione con il kit MicroSeq 500. 3/18 (17%) risultavano comunque correttamente identificati con i metodi tradizionali mentre per 15/18 (83%) è stato necessario il sequenziamento.

I nostri dati evidenziano inoltre la presenza di ceppi di *P. aeruginosa* e *B. cepacia* complessivamente resistenti.

Conclusioni. Il sequenziamento del gene 16S rRNA ha rappresentato un valido supporto per una corretta e rapida identificazione dei microrganismi responsabili di Fibrosi Cistica altrimenti non identificati con i metodi tradizionali (29.4%) anche se in 3 casi (5.9%) l'indagine molecolare non ha dissipato completamente i dubbi interpretativi. Un aspetto non trascurabile sono i costi relativamente contenuti del kit MicroSeq 500 che lo rende facilmente applicabile nei laboratori di Microbiologia con esperienza nell'utilizzo delle indagini molecolari.