

in genere mediante inalazione di aerosol contaminato. Trattandosi di batterio acquatico ubiquitario con serbatoio ambientale, la tipizzazione molecolare dei ceppi di *Legionella* isolati dal paziente e dall'ambiente è fondamentale in quanto permette di stabilire la relazione di clonalità dei ceppi epidemiologicamente correlati e di riconoscere la sorgente di infezione. In questo lavoro viene presentata l'utilità delle tecniche molecolari nello studio di 7 episodi di legionellosi.

Metodi.

I ceppi clinici ed ambientali sono stati isolati con procedure adottate nel nostro Laboratorio dal 1983, mediante l'uso combinato di vari terreni (BCYE, BMPA e MWY) e di diversi trattamenti (acidi, calore). I ceppi sono stati tipizzati con metodi sierologici; gli isolati di *L. pneumophila* sierogruppo 1 sono stati anche tipizzati con anticorpi monoclonali (MAb). I ceppi clinici e ambientali correlati isolati in 5 episodi di infezione nosocomiale e in 2 comunitari sono stati esaminati con PFGE (pulsed field gel electrophoresis), con RAPD-PCR (random primers amplified polymorphic DNA), con sequenziamento del gene *mip* o con SBT (sequence-based typing) secondo il metodo EWGLI.

Risultati.

In tutti i casi esaminati i ceppi isolati dal paziente e quelli ambientali correlati presentavano lo stesso profilo con le tecniche molecolari, mentre risultavano differenti rispetto a quelli non correlati. Le tecniche utilizzate, pur con diverso grado di potere discriminante e di sensibilità, sono risultate utili allo scopo. La combinazione con la tipizzazione con MAb ha fornito risultati ottimali.

Conclusione.

La tipizzazione genomica dei ceppi ha consentito di riconoscere in maniera inequivocabile la sorgente di infezione nei 7 episodi studiati. Si ribadisce ancora l'importanza della ricerca colturale dai campioni clinici; la disponibilità dei ceppi clinici ed ambientali consente infatti la loro tipizzazione con tecniche molecolari, che si sono mostrate di grande utilità ai fini epidemiologici per il riconoscimento della sorgente di infezione.

CO5.3

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI MICOBATTERI: "INNO-LIPA" E SEQUENZIAMENTO A CONFRONTO

Morelli S.; Pignatelli S.; Torsani E.*; Pignatelli S.*; Dal Monte P.; Sambri V.; Nanetti A.

DMCSS, sez. Microbiologia, Via Massarenti 9, 40138, Bologna,

*Specializzandi Scuola Spec. Microbiologia e Virologia, UNIBO.

Introduzione.

L'elevato incremento delle infezioni da *M.tuberculosis*

complex e la comparsa di micobatteri non tubercolari *MOTT*, ha reso necessario introdurre nella routine diagnostica l'utilizzo di tecnologie molecolari, sia per ridurre i tempi di refertazione, che per giungere ad una identificazione inequivocabile.

Materiali e metodi.

A tale scopo è stato introdotto nel nostro laboratorio INNO-Lipa MYCOBACTERIA v-2 (ditta INNOGENETICS) che prevede l'amplificazione del DNA del micobatterio in corrispondenza della regione spaziatrice 16S-23S del gene che codifica per l'RNA ribosomiale (rRNA) e successiva ibridazione con sonde a sequenza specifica per l'identificazione del genere *Mycobacterium* e 16 diverse specie nell'ambito dello stesso genere.

Tuttavia, nel 16,5% dei casi non è stato possibile identificare la specie micobatterica.

A partire da gennaio 2005 abbiamo quindi estratto e conservato il DNA dei micobatteri da noi isolati. Su 50 micobatteri atipici isolati, in 8 casi non è stato possibile ottenere l'identificazione. Abbiamo pertanto valutato l'utilità di un saggio PCR "home-made" (Heekyung *et al*, J.Clin Microb., 2000; 38:4080-4085), mediante amplificazione della sequenza spaziatrice 16S-23S (ITS), successivo sequenziamento e confronto con le sequenze depositate in GenBank.

Risultati.

Nel corso dello studio abbiamo sequenziato 12 campioni precedentemente tipizzati (4 *Myc.tuberculosis* 2 *Myc.avium*; 1 *Myc.kansasii*; 1 *Myc.xenopi*; 1 *Myc.genevense*; 2 *Myc.chelonae*, 1 *Myc.gordonae*) e 8 campioni non identificati dal sistema INNO-Lipa. Delle 12 sequenze di micobatteri già noti, abbiamo ottenuto una concordanza del 100%. Tra gli 8 isolati non identificati, le sequenze sono state attribuite ai seguenti micobatteri: 1 *Myc.avium complex*, 2 *Myc.mucogenicum*; 3 *Myc.arupense*, 1 *Myc.gallinarum* e in un solo caso non è stato possibile assegnare la specie.

Conclusioni.

In definitiva quindi il sequenziamento può permettere un'identificazione sicura e accurata delle varie specie di micobatteri utile non solo ai fini epidemiologici, ma anche clinici. Inoltre non va sottovalutato che il sequenziamento è decisamente più economico rispetto al test INNO-Lipa.