

130

NUOVA REAL TIME RT-PCR PER L'IDENTIFICAZIONE E LA RILEVAZIONE QUANTITATIVA DEL VIRUS CHIKUNGUNYA IN CAMPIONI BIOLOGICI ED IN COLTURE CELLULARI

Carletti F., Bordi L., Chiappini R., Ippolito G., Sciarone M.R., Capobianchi M.R., Di Caro A., Castilletti C.

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani", Roma

Introduzione. Il virus Chikungunya (CHIKV) è un *alphavirus*, trasmesso all'uomo attraverso il morso di un insetto vettore, principalmente zanzare del genere *Aedes*. Una estesa epidemia è iniziata nel 2005 in un'isola dell'Oceano Indiano, possedimento territoriale della Francia, La Reunion. Dai primi mesi del 2006 l'epidemia si è estesa anche ad altre isole ed arcipelaghi dell'Oceano Indiano, oltre che ai paesi che si affacciano sulla parte orientale come Malesia, Indonesia e soprattutto India. Molti casi sono stati importati in Europa ed anche in Italia. La diagnosi d'infezione da CHIKV è fondamentale per il controllo dell'epidemia.

Metodi. Nei laboratori di Virologia dell'INMI è stata messa a punto una nuova Real Time RT-PCR basata su sonde FRET, che ha come gene *target* il gene nsP1. *Primers* e sonde sono stati disegnati utilizzando il LightCycler probe designer V. 2.0 software.

Risultati. Questo test ha una sensibilità di 20 copie/reazione ed un *range* di linearità compreso tra 3×10^1 e 6×10^8 copie/reazione. Il dosaggio della viremia da CHIKV su sieri di pazienti con infezione acuta va da $1,3 \times 10^5$ a 6×10^8 copie/reazione. Per validare il test quantitativo, sono stati realizzati esperimenti *in vitro* di inibizione della replicazione virale, mediante l'utilizzo di IFN *alpha*. La replicazione del virus è stata valutata sia titolando la capacità infettante sia dosando la quantità di RNA del virus neo-prodotto. Come atteso, abbiamo osservato un'inibizione della produzione di particelle virali sia in termini di infettività che di produzione di RNA.

Conclusioni. Il metodo descritto è un valido strumento per la rapida rilevazione del Virus Chikungunya così come per la determinazione della carica virale nei pazienti con infezione acuta. Inoltre, l'ampio *range* di linearità ne fa un ottimo strumento per gli studi *in vitro* ogniqualvolta si presenti la necessità di quantificare la replicazione virale, come accade negli studi di efficacia dei farmaci antivirali.

131

AUMENTO DI INCIDENZA DI S. GIVE IN PIEMONTE. ANALISI MOLECOLARI E VALUTAZIONI EPIDEMIOLOGICHE

Kroumova V., Grasso S., Caroppo S., Camaggi A., Grossini E., Macaluso P., Brunelli G., Fortina G.

Azienda "Ospedale Maggiore della Carità" - Novara - Laboratorio Microbiologia e Virologia

La sorveglianza delle infezioni alimentari da *Salmonella* rappresenta ancora oggi un momento importante nel controllo di queste patologie. Nell'ambito della attività di prevenzione, in Piemonte, si è realizzato a partire dall'anno 2001 un pro-

gramma di sorveglianza epidemiologica.

Durante l'anno 2005 tale attività è proseguita ed ha portato alla tipizzazione sierologica di 730 ceppi di *Salmonella*. All'interno dei vari sierotipi identificati si è evidenziata una frequenza anomala di *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Give che, dai normali 1-2 ceppi/anno, improvvisamente ha visto aumentare la sua prevalenza a 21 ceppi/anno. L'analisi molecolare di questi è stata eseguita mediante PFGE utilizzando l'enzima di restrizione XbaI e mediante la metodica rep-PCR (Diversilab).

I risultati ottenuti con le due tecniche hanno evidenziato la presenza di due cluster con percentuali di similarità molto elevate al loro interno e una notevole corrispondenza tra le due metodiche. Purtroppo l'impossibilità di disporre di dati epidemiologici non consente di trarre conclusioni definitive, anche se l'ipotesi di una piccola epidemia alimentare veicolata dai canali della grande distribuzione può risultare suggestiva.

132

VEQ IN BIOLOGIA MOLECOLARE (HCV, HIV, HBV): PRIME ESPERIENZE

Colao M.G.¹, Parri F.¹, Borsotti M.², Quercioli M.².

¹ Laboratorio di Sieroimmunologia, AOU-Careggi, (FI)

² Centro Regionale per il C.Q. AOU-Careggi (FI)

Introduzione. In questo lavoro vengono presentati i risultati del Programma di Verifica Esterna di Qualità per il dosaggio di HCV, HBV e HIV con tecniche di Biologia Molecolare realizzato nel 2006. Queste tecniche hanno raggiunto un ruolo consolidato nella ricerca e nella quantificazione dei genomi virali e sono utilizzate sia per la diagnosi che per la valutazione del decorso della malattia. Diventa pertanto indispensabile verificare costantemente la comparabilità dei risultati tramite una valutazione esterna della qualità.

Materiali e Metodi. Hanno partecipato 38 laboratori ai quali è stato inviato un campione positivo per ciascuno dei virus analizzati. Le risposte ricevute sono state 86 e sono state ottenute con metodiche sia qualitative (TMA, PCR) che quantitative (bdNA, PCR end-point, PCR real time) utilizzando come unità di misura il numero di copie/ml o unità internazionali (UI/ml).

Risultati. 1° Campione HCV RNA

Risposte: 32 Positivi: 30 Negativi: 2

Dei 30 positivi, 4 risposte erano qualitative e 26 quantitative, di cui 25 espresse in UI/ml e 1 in copie/ml.

I 25 valori espressi in UI/ml hanno dato media 18.465.

Esprimendo il valore in \log_{10} abbiamo ottenuto una media di 4.27 con sd 0.51 e cv pari a 11.9.

2° Campione HIV RNA

Risposte: 28 Positivi: 28 Negativi: 0

Dei 28 positivi, 4 risposte erano qualitative e 24 quantitative, di cui 3 espresse in UI/ml e 21 in copie/ml.

I 24 valori espressi o trasformati in copie/ml hanno dato media 49.450.

Esprimendo il valore in \log_{10} abbiamo ottenuto una media di 4.69 con sd 0.37 e cv pari a 7.9.

3° Campione HBV DNA

Risposte: 26 Positivi: 26 Negativi: 0

Dei 26 positivi, 7 risposte erano qualitative e 19 quantitative, di cui 18 espresse in UI/ml e 1 in copie/ml.

I 18 valori espressi in UI/ml hanno dato media 145.188.

Esprimendo il valore in \log_{10} abbiamo ottenuto una media di 5.16 con sd 0.26 e cv pari a 5.0.

L'analisi statistica è stata effettuata anche per i risultati raggruppati in base al sistema analitico utilizzato.

Conclusioni. I primi risultati hanno consentito di effettuare una valutazione positiva dello stato dell'arte. Particolarmente utile si è dimostrato l'utilizzo di standard internazionali che permettono di confrontare i risultati esprimendoli in UI/ml. L'esperienza fatta evidenzia che anche nel settore della Biologia Molecolare i programmi VEQ sono necessari al fine di una standardizzazione e al miglioramento della qualità dei risultati.

133

***bla*_{ACT2} : UN NUOVO DETERMINANTE DI RESISTENZA DI CLASSE C NELLA SPECIE ENTEROBACTER**

D'Andrea M.M.¹, Giani T.¹, Migliavacca R.², Pagani L.², Rossolini G.M.¹.

¹Laboratorio FI.BI.M., Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Siena

²Dipartimento di Scienze Morfologiche Eidologiche e Cliniche, sezione di Microbiologia, Università di Pavia, Pavia

Introduzione. I determinanti di resistenza antibiotica di classe C attivi sui beta-lattamici costituiscono un problema di grande rilevanza per il trattamento delle infezioni nosocomiali. La loro sovrapproduzione infatti è spesso associata a multiresistenza, e la problematica è ulteriormente complicata se alla sovrapproduzione enzimatica è associata anche una ridotta permeabilità di membrana al farmaco.

Metodi. In questo lavoro è stato analizzato un isolato clinico multiresistente appartenente alla specie *Enterobacter*, che mostrava un fenotipo di sovrapproduzione di ampC rilevato con metodiche standard. La identificazione a livello di specie è stata effettuata tramite test biochimici, sequenziamento del DNA ribosomiale 16S e del gene *hsp60*. Il determinante di resistenza è stato amplificato tramite PCR, ed il frammento così ottenuto è stato sottoposto a sequenziamento su doppio filamento.

Risultati. I risultati di identificazione di specie, effettuata sia con tecniche biochimiche che molecolari, hanno fornito risultati non univoci, ma che comunque hanno portato alla identificazione dell'isolato come appartenente al genere *Enterobacter*. Il sequenziamento dell'amplificato ottenuto con i primers specifici per i determinanti di resistenza di classe C del gruppo ACT/MIR, ha portato all'individuazione di una nuova variante allelica di *bla*_{ACT-1}, chiamata *bla*_{ACT-2}. *bla*_{ACT-2} differisce da *bla*_{ACT-1} per 4 nucleotidi mentre, a livello aminoacidico, essa differisce da ACT-1 per 1 aminoacido. *bla*_{ACT-2} è stata depositata nel database EMBL con l'*accession number* AM076977.

Conclusioni. Il gene *bla*_{ACT-2} è stato amplificato da un ceppo clinico appartenente al genere *Enterobacter*. Le analisi biochimiche e molecolari portano alla conclusione che l'isolato è strettamente legato alle specie *sakazakii*, *cloacae* ed *amnigenus* anche se, come per altri casi riportati in letteratura, l'identificazione univoca a livello di specie più risolutiva non è possibile. Determinanti del gruppo ACT/MIR sono stati descritti in ceppi clinici solo sporadicamente e comunque, come si evince dalla letteratura, questa è la prima descrizione in Italia.

134

CORRELAZIONE TRA VARIANTI ALLELICHE DEI GENI *bla*_{OXA-51}-SIMILI E CLONALITÀ IN ACINETOBACTER BAUMANNII

D'Andrea M.M.¹, Giani T.¹, Fina G.¹, Mereuta A.I.², Migliavacca R.³, Pagani L.³, Rossolini G.M.¹

¹Laboratorio FI.BI.M., Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Siena

²Universitatea de Medicină și Farmacie Gr.T. Popa Iasi, Facultatea de Medicină, Disciplina de Microbiologie Medicală

³Dipartimento di Scienze Morfologiche Eidologiche e Cliniche, sezione di Microbiologia, Università di Pavia, Pavia

Introduzione. Stipiti di *Acinetobacter baumannii* multiresistenti costituiscono un grave problema nelle infezioni nosocomiali. In tutto il mondo sono state descritte epidemie ospedaliere dovute a tale microrganismo che è divenuto endemico in alcune aree geografiche. La comparazione di isolati collezionati da differenti autori non è di semplice esecuzione principalmente poiché richiede lo scambio di isolati tra differenti laboratori e la standardizzazione della tecnica di genotipizzazione impiegata.

Recentemente i determinanti di tipo *bla*_{OXA-51} simili sono stati proposti come un buon marcatore per l'identificazione di specie, in alternativa a precedenti metodologie molecolari. L'obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare la correlazione tra i determinanti residenti di tipo *bla*_{OXA-51} simili e i genotipi in una collezione di isolati clinici di *A. baumannii*.

Metodi. In questo lavoro sono stati analizzati 155 isolati clinici ottenuti da 15 differenti ospedali. L'identificazione ed i test sulla suscettibilità antibiotica sono stati eseguiti seguendo le procedure standard. La genotipizzazione è stata effettuata attraverso le tecniche di RAPD e PFGE. La rilevazione dei determinanti OXA-51 simili è stata effettuata tramite PCR seguita da sequenziamento su doppio filamento.

Risultati. Entrambe le tecniche di genotipizzazione utilizzate hanno portato all'identificazione di 5 gruppi principali di *A. baumannii*. Ciascun gruppo è caratterizzato da uno specifico gene residente di tipo *bla*_{OXA-51} simile. Sono state descritte 3 nuove varianti alleliche.

Conclusioni. È stata trovata una stretta corrispondenza tra la variante *bla*_{OXA-51} simile ed il genotipo di appartenenza di ogni isolato. I risultati ottenuti suggeriscono quindi che la tipizzazione dei determinanti di resistenza *bla*_{OXA-51} simili può essere un valido strumento per la rapida genotipizzazione di isolati clinici di *A. baumannii*.

135

PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRODUTTORE DELLA METALLO- β -LATTAMASI IMP-13 IN UN PAZIENTE AFFETTO DA FIBROSI CISTICA

Fiscarelli E.¹, Lucidi V.¹, Concato C.¹, Pollini S.², Mugnaioli C.² e Rossolini G.M.²

¹Fibrosi Cistica, Ospedale Bambin Gesù, Roma, Italia.

²Sezione di Microbiologia, Dip. di Biologia Molecolare, Università di Siena, Italia.

Introduzione. *Pseudomonas aeruginosa* è il più importante