

146

COAMPLIFICAZIONE DELLE REGIONI 5'UTR E CORE DI HCV E RIDEFINIZIONE DEL GENOTIPO: RISULTATI CLINICO-TERAPEUTICI

Pegoraro F., Alliod S., Montanera P.G., Falcone P.

ASL Valle d'Aosta S.C. Microbiologia, Via G. Rey 5, I I 100 Aosta

Introduzione. Il confronto di numerosi isolati di HCV ha permesso di dimostrare l'esistenza di gruppi di virus che presentano un livello di divergenza tra le loro sequenze genomiche pari al 35% circa (genotipi). Sono stati identificati 6 genotipi virali principali che si suddividono a loro volta in sottotipi con livelli di divergenza inferiori e pari a circa il 20%.

L'infezione di tipo 1b si associa più frequentemente a forme gravi di malattia, quali la cirrosi e il tumore, sia per una maggiore aggressività del virus sia per un effetto "coorte" e cioè una maggiore persistenza del virus in circolo, seppure sottoposta a terapia antivirale. La coamplificazione della regione al 5'UTR e core consente la discriminazione tra i due sottotipi 1a ed 1b e anche la variante 6cl.

Metodi. Sono stati analizzati 40 campioni di genotipo 1 indeterminato. Il plasma dei campioni conservato a -70°C è stato sottoposto ad estrazione dell'RNA utilizzando il kit Ampliprep di Roche e successivamente amplificato con il kit Versant HCV Amplificazione 2.0 di Siemens su termal cycler AB2400. L'amplificato è stato conservato a -20°C ed il genotipo è stato determinato con il kit Versant HCV genotipo 2.0 di Siemens.

Risultati. Tutti i 40 campioni analizzati sono stati correttamente discriminati nel sottotipo, in particolar modo il 95% è risultato appartenente al genotipo 1a ed il restante 5% all'1b.

Conclusioni. Una definizione immediata e precisa del genotipo consente l'applicazione di protocolli terapeutici più mirati evitando la somministrazione di dosi maggiori e per tempi prolungati di interferone e ribavirina, sempre in accordo con i dati clinici e citologici. I pazienti con genotipo 1 indeterminato vengono infatti preventivamente sottoposti a protocollo terapeutico per genotipo 1b considerato più aggressivo e farmaco-resistente. Ne consegue che tale determinazione migliora l'appropriatezza terapeutica, a favore del paziente, ed evita il consumo inappropriato di farmaco.

147

PSEUDOMONAS AERUGINOSA E METALLO- β -LATTAMASI IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA: PREVALENZA E PERSISTENZA

Pollini S.¹, Mugnaioli C.¹, Campana S.², Ravenni N.², Neri A.S.², Taccetti G.² e Rossolini G.M.¹¹Sezione di Microbiologia, Dip. di Biologia Molecolare, Università di Siena, Italia.²Centro Fibrosi Cistica, Dip. di Pediatria, Università di Firenze, Italia.

Introduzione. L'acquisizione e la diffusione in isolati di *Pseudomonas aeruginosa* delle metallo- β -lattamasi (MBL) rappresenta una notevole problematica in ambito clinico; isolati produttori di MBL sono stati descritti in epidemie ospedaliere, ma le conoscenze sulla loro diffusione in pazienti con Fibrosi Cistica (FC) risultano ancora limitate. Lo scopo del lavoro è stato quello di studiare la prevalenza delle MBL in ceppi di *P.aeruginosa* da FC, e di analizzare la persistenza nel tempo, la clonalità dei ceppi MBL-positivi ed il contesto genico dei determinanti di resistenza.

Metodi. 44 ceppi di *P.aeruginosa* resistenti ai carbapenemi, provenienti da 39 pazienti cronicamente colonizzati in cura presso il Centro FC di Firenze, sono stati analizzati per la produzione di MBL attraverso E-test e saggi spettrofotometrici. I geni MBL sono stati analizzati mediante ibridazione, PCR e sequenziamento del DNA. In caso di positività per MBL, sono stati analizzati gli isolati retrospettivi dallo stesso paziente. La clonalità dei ceppi MBL-positivi è stata analizzata mediante genotipizzazione (RAPD/PFGE).

Risultati. La produzione di MBL è stata rilevata in 2 dei 44 (5%) isolati, provenienti da 2 differenti pazienti. Gli isolati MBL-positivi possedevano due distinte varianti del gene *bla_{VIM}*, identificate come *bla_{VIM-1}* e *bla_{VIM-2}*. L'analisi degli isolati retrospettivi dei due pazienti ha mostrato la persistenza dei determinanti *bla_{VIM-1}* e *bla_{VIM-2}* per sei e otto anni rispettivamente. L'analisi genotipica ha stabilito la clonalità degli isolati *bla_{VIM-2}*-positivi mentre gli isolati *bla_{VIM-1}*-positivi mostravano una maggiore variabilità genetica. Le due varianti geniche sono risultate parte di due distinti integroni di classe 1.

Conclusioni. Due varianti del gene *bla_{VIM}* sono state isolate in ceppi di *P.aeruginosa* da pazienti con FC cronicamente colonizzati. La diffusione di geni MBL in *P.aeruginosa* da pazienti con FC è un fenomeno allarmante che può avere importanti implicazioni di tipo terapeutico.

Si ringrazia la Fondazione Fibrosi Cistica per il suo contributo (FFC#14/2006).