

180

## FUSARIOSI DISSEMINATA IN UN PAZIENTE IMMUNOCOMPROMESSO

Leo L.<sup>1</sup>, Musio K.<sup>1</sup>, D'Aversa P.<sup>1</sup>, Rana A.<sup>2</sup>, Greco G.<sup>2</sup>, De Francesco R.<sup>2</sup>, Pavone V.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Sez. Microbiologia, U.O. Medicina di Laboratorio

<sup>2</sup>Rep. Ematologia, A.O. "Pia Fondazione di Culto e Religione Card. Panico", v. Pio X, Tricase (Le)

**Introduzione.** Il micete ialino *Fusarium solani* (*Fs*), considerato un comune contaminante, sporadicamente può causare infezioni profonde in pazienti immunocompetenti ed infezioni sistemiche in pazienti immunocompromessi. In questo studio *Fs* è stato isolato da un paziente affetto da leucemia mieloide acuta, dapprima da un tampone nasale di controllo e dopo due settimane da una sua emocoltura positiva. Il paziente, con malattia refrattaria in progressione, al momento dell'infezione da *Fs* era in stato di neutropenia di grado 4 (<500 neutrofili) e in profilassi antifungina con itraconazolo per os. La comparsa di lesioni nodulari cutanee associata ad emocolture positive per *Fs*, ha suggerito un quadro clinico di infezione disseminata.

**Metodi.** L'isolamento primario è stato effettuato su agar destrosio Sabouraud incubato a 30°C per 3-7 giorni e su flaconi di emocoltura (Bact/Alert, Bioré) incubati a 35°C per 7 giorni. Successivamente una coltura pura ottenuta da singolo tipo ifale è stata inoculata su agar patata destrosio (PDA) incubato a 25°C. Per confermare l'identificazione fenotipica, il DNA, amplificato per PCR, è stato sottoposto ad analisi di sequenza.

**Risultati.** Su PDA le colonie (a rapida crescita) presentavano micelio cotonoso, color bruno chiaro. Microscopicamente si osservavano ife ialine e settate, numerosi microconidi ovali o fusiformi, con 1 o 2 celle, su corte e strette filidi, macroconidi arcuati con 3-5 celle, clamidoconidi globosi singoli o in coppia. Il DNA dell'isolato sequenziato e comparato con sequenze di DNA mediante allineamento in BLAST ha mostrato il 100% di omologia con *Fs*. L'accession number dell'isolato è DQ535185.

**Conclusioni.** Nei miceti filamentosi la diagnosi di specie, spesso difficoltosa per la notevole variabilità fenotipica degli isolati, oltre che un valore epidemiologico assume a volte rilevanza terapeutica. Pertanto in questo studio l'identificazione morfologica macroscopica e microscopica di *Fs*, è stata confermata dai risultati dell'analisi di sequenza.

181

## LA TM-REAL TIME SYBR GREEN PCR PER LA DISCRIMINAZIONE RAPIDA DEI GENOTIPI HPV A BASSO RISCHIO

Leo G.<sup>°</sup>, Pisanò M.<sup>°</sup>, Pitotti E.<sup>°</sup>, Ciannamea B.<sup>°</sup>, Megha M.<sup>°</sup>, Spedicato S.\*<sup>°</sup>, Storelli F.\*<sup>°</sup>, Vergara D.\*<sup>°</sup>, Moschettini G.\*<sup>°</sup> ze Tinelli A.<sup>°</sup>.

<sup>°</sup>U.O. Biol. Mol. e Oncol. Sperim., P. Oncologico "Vito Fazzi" AUSL/LEI P.zza Muratore 73100 Lecce;

<sup>°</sup>U.O. Microb. e Virol. AUSL/LEI P. Bottazzi 73100 Lecce;

(\*Dip.Sc.eTecn.Biol.eAmbien. (DiSTeBA) Università degli Studi di Lecce strada provinc. Lecce-Monteroni 73100 Lecce;

<sup>°</sup>U.O. Ginecol. Ospedale "Vito Fazzi" AUSL/LEI P.zza Muratore 73100 Lecce.

**Introduzione.** La diagnosi dell'infezione da HPV si basa

sull'analisi molecolare mediante PCR delle ORF L1 ed E6/E7. Numerose metodiche sfruttano l'analisi delle differenze delle sequenze nucleotidiche di queste regioni per discriminare i diversi genotipi virali. Scopo del lavoro è mettere a punto un sistema rapido di indagine che impiega l'analisi delle differenze esistenti in termini di percentuale C+G nelle ORF L1 dei tipi virali di HPV, per la rivelazione e genotipizzazione dell'infezione da papillomavirus mediante l'analisi delle curve di melting degli amplificati.

**Metodi.** Il DNA virale è stato purificato da 50 campioni provenienti da *scrape* cervicale, amplificato mediante i primer MY09 e MY11 e i prodotti sequenziati tramite un sequenziatore ABI Prism 310 (Applied Biosystem). I risultati sono stati confrontati con le sequenze in banca dati. L'analisi delle curve di melting è stata condotta con il fluoroforo SYBR Green in un sistema PCR Real Time (Roche).

**Risultati.** I virus genotipizzati tramite sequenziamento sono stati analizzati con PCR Real Time in modo da poter associare a ciascun genotipo una *Temperatura di melting* (*Tm*) caratteristica. Allo scopo, oltre al contenuto in CG, sono state determinate le opportune condizioni sperimentali per eseguire le indagini. Si è quindi testato il protocollo conducendo l'analisi su campioni incogniti. I risultati più significativi si sono ottenuti per l'identificazione dei genotipi HPV16 e 18 e HPV6 e 11, dove all'analisi delle *Tm* si riscontra una differenza maggiore di un grado tra i genotipi ad alto rischio (81,28°C ± 0.29 S.D.) e quelli a basso rischio (82,48°C ± 0.27 S.D.) che permette così di discriminare i tipi 6 ed 11 dagli altri.

**Conclusioni.** Rispetto a metodiche tradizionali la Real Time PCR offre il vantaggio di essere più rapida, molto più sensibile e, con la determinazione delle *Tm*, fornisce indicazioni sui genotipi responsabili dell'infezione da HPV utili per la messa a punto di un protocollo diagnostico per la discriminazione rapida delle infezioni da ceppi a basso rischio.

182

## EPISODIO EPIDEMICO DI TOSSINFEZIONE ALIMENTARE ASSOCIATO AD INFEZIONE DA ESCHERICHIA COLI ENTERO-AGGREGATIVO IN UN AGRITURISMO

Staffolani M. (a), Fisichella S. (a), Striano G. (a), Colletta S. (b), Ferri G. (b), Minelli F. (c), Marziano M.L. (c), Scavia G. (c), Caprioli A. (c)

a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Macerata;

b) ASL Civitanova Marche;

c) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

**Introduzione.** *Escherichia coli* entero-aggregativi (EAEC) presentano un particolare profilo di adesione alle cellule in coltura e sono considerati come un gruppo distinto di *E. coli* patogeni. Le infezioni da EAEC sono particolarmente frequenti nei paesi in via di sviluppo dove sono state spesso associate a diarrea protratta; sono invece piuttosto rare nei paesi industrializzati, inclusa l'Italia, dove sono generalmente associate a diarrea acquosa di tipo secretivo di breve durata. Viene qui descritto un episodio di tossinfezione alimentare associato ad infezione da EAEC.

**Caso clinico.** Nel febbraio 2006, si sono verificati due episodi di tossinfezione (16 febbraio e 26 febbraio) presso un

agriturismo; il primo episodio ha riguardato 14 di 23 commensali (tasso di attacco: 66%), il secondo 16 di 24 (61%). In entrambi la sintomatologia è stata lieve (diarrea in 24 casi, vomito in 15, febbre in 12) e nessun soggetto ha richiesto ospedalizzazione. L'indagine epidemiologica indicava, in entrambi gli episodi, una possibile associazione con il consumo di due tipi di formaggio pecorino prodotto presso lo stesso agriturismo con latte ovino non pastorizzato.

Campioni di feci raccolti da 32 soggetti e da 3 addetti alla preparazione degli alimenti e alla gestione dell'agriturismo risultavano negativi per *Salmonella*, *Shigella*, *Y. enterocolitica* e *Campylobacter*. Ceppi di *E. coli* ottenuti da 13 casi coinvolti nel secondo episodio e dai 3 addetti sono stati esaminati mediante PCR per la presenza di geni di virulenza caratteristici dei principali gruppi patogeni. Da 6 dei 13 casi e da un addetto alla ristorazione è stato isolato *E. coli* entero-aggregativo di sierogruppo O78. Il campionamento di alimenti è stato limitato ai resti del pasto del secondo episodio e ad alcuni alimenti non inclusi nel menù ma conservati nei frigoriferi della cucina. Tutti i campioni sono risultati negativi per la presenza di agenti patogeni comuni (*Salmonella*, *Shigella*, *Y. enterocolitica*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Clostridium perfringens*). I 2 formaggi pecorini presentavano una carica di *E. coli* superiore a 106 CFU/g, anche se l'esame PCR dava esito negativo per la presenza di geni EAEC.

**Conclusioni.** L'episodio descritto rappresenta la prima segnalazione di un episodio epidemico di infezione da EAEC in Italia e pone il sospetto di un'origine zoonosica di queste infezioni, finora mai ipotizzato.

---

## 183

### IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI MUTAZIONI CONFERENTI RIFAMPICINA E ISONIAZIDE RESISTENZA IN *M. tuberculosis* IN CAMPIONI CLINICI DIRETTI

Miotto P<sup>1</sup>, Piana F<sup>1,2</sup>, Migliori GB<sup>3</sup>, Penati V<sup>2</sup>, Lacchini C<sup>2</sup>, Cirillo D<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unità Batteri Patogeni Emergenti, Istituto Scientifico San Raffaele, via Stamira d'Ancona 20, 20127 Milano

<sup>2</sup> Istituto Villa Marelli, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Viale Zara 81, 20159, Milano

<sup>3</sup> WHO collaborating centre FS. Maugeri-Tradate

**Introduzione.** Data l'importanza dell'individuazione rapida di pazienti infetti da MTB-MDR, obiettivo dello studio è valutare la capacità del test GenoType-MTBDR come strumento di diagnosi rapida di casi MDR in campioni clinici diretti. Per la sorveglianza delle farmacoresistenze su ampia scala, anche in Paesi in cui la coltura non è eseguita in routine, si sta valutando la possibilità di utilizzare un supporto (GenoCard) trasportabile e utilizzabile direttamente in reazione di PCR per determinare farmacoresistenze mediante approccio molecolare.

**Metodi.** In uno studio prospettico, si sono analizzati 68 campioni clinici diretti con sospetto di TB attiva mediante il test commerciale GT-MTBDR (Hain Lifescience, Nehren, Germany) che sfrutta la tecnologia LiPA e permette la determinazione di rifampicina/isoniazide-resistenza, identificando mutazioni in *rpoB* e *katG*. L'antibiogramma è stato eseguito mediante MGIT.

**Risultati.** Dei 68 campioni esaminati, 56 hanno fornito un

pattern di amplificazione ed ibridizzazione tale da permettere un giudizio sulla positività per MTB e sul presunto pattern di sensibilità/resistenza visualizzata come ibridizzazione con probe specifici. 12 campioni (11/12 BAAR-negativi) non hanno sviluppato un profilo di amplificazione atteso o interpretabile. Il test ha individuato 3 campioni MDR, tutti confermati dall'antibiogramma. 4 campioni sono stati identificati come isoniazide-resistenti a seguito dell'identificazione della mutazione AGC315ACC in *katG*. Per 10 campioni BAAR-positivi l'esperimento si è rivelato riproducibile utilizzando materiale fissato su GenoCard.

**Conclusioni.** Il test ha identificato correttamente 3 campioni MDR. La valutazione della sola mutazione S315T in *katG* ha permesso di individuare il 60% dei campioni fenotipicamente isoniazide-resistenti ed è pertanto insufficiente a garantire sensibilità adeguata per rilevare isoniazide-resistenza. Approcci genetici che hanno come target *rpoB* sono invece strumenti utili per l'identificazione rapida di MTB-MDR in popolazioni selezionate. La GenoCard, di facile inattivazione e trasporto, può favorire l'applicazione di tecniche molecolari per la raccolta dati di rifampicina-resistenza in Paesi in cui la coltura non è eseguibile in routine.

---

## 184

### STUDI CLINICI RELATIVI AI GENOTIPI gN DI CITOMEGALOVIRUS COME DETERMINANTI DI VIRULENZA DEI CEPPI WILD-TYPE

Pignatelli S., Dal Monte P., Camozzi D., Lazzarotto T., Landini M.P.

DMCSS, Sez. Microbiologia, Università di Bologna, via Massarenti 9, 40138 Bologna.

**Introduzione.** Gli isolati clinici di HCMV presentano caratteristiche immuno-patogenetiche estremamente differenti, pur avendo circa il 90-95% di omologia a livello genomico. L'infezione da HCMV è in grado di originare un ampio spettro di manifestazioni cliniche, potendo il virus infettare numerosi tipi cellulari, con differenti efficienze replicative, stabilendo infezioni persistenti o latenti. Le differenze biologico-comportamentali dei diversi ceppi *wild-type* di HCMV sono state imputate a variazioni all'interno del genoma virale riguardanti *loci* polimorfici ipervariabili, codificanti per *target* immunologici o prodotti fondamentali per la replicazione e l'architettura virale. Tra i geni candidati a *marker* di polimorfismo e patogenicità si annovera UL73, codificante per la glicoproteina gN del complesso immunogeno di *envelope* gC-II, coinvolto nell'*attachment* e *spread* virale. Isolati clinici di HCMV presentano una delle 7 varianti genomiche di gN, denominate gN-1, gN-2, gN-3a, gN-3b, gN-4a, gN-4b, gN-4c.

**Metodi.** L'ORF UL73 è stata amplificata dal genoma di HCMV mediante *Nested-PCR* e il genotipo gN determinato mediante sequenziamento e/o *RFLP*. Le popolazioni analizzate nel presente lavoro sono state le seguenti: donatori immunocompetenti con infezione latente da HCMV; trapiantati d'organo solido con infezione in atto da HCMV; neonati con infezione congenita da HCMV. Le distribuzioni ottenute sono state confrontate mediante test del chi-quadro, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

**Risultati.** Il confronto tra le diverse frequenze genotipiche riscontrate suggerisce che il genotipo gN-1 possa essere caratterizzato da una ridotta virulenza, mentre le varianti