

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 P¹, Piana F^{1,2}, Migliori GB³, Penati V², Lacchini C², Cirillo D¹

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

² Istituto Villa Marelli, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Viale Zara 81, 20159, Milano

³ 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

appartenenti al gruppo gN-4 rappresenterebbero fenotipi maggiormente virulenti. In particolare il gN-4b ed il gN-4c risulterebbero prognostici di manifestazioni cliniche severe dell'infezione da HCMV.

Conclusioni. Gli studi presentati dimostrano come in ambito clinico, nonché nella pratica per la sicurezza del trapianto e trasfusionale, possa risultare importante identificare non solo la presenza del genoma virale, ma anche il ceppo virale di appartenenza, informazione a valore prognostico nel corso del monitoraggio diagnostico e terapeutico del paziente con infezione da HCMV.

185

IDENTIFICAZIONE DI *CANDIDA* SPP. E GRUPPI TASSONOMICI CORRELATI MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DELLA REGIONE D2 DEL GENE CODIFICANTE LA LSU RIBOSOMALE

Putignani L.¹, Paglia M.G.¹, Bordi E.¹, Nebuloso E.¹, Pucillo L.P.¹, Visca P.^{1,2}

¹Unità di Microbiologia Molecolare, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive I.R.C.C.S. "Lazzaro Spallanzani", Via Portuense 292, 00149 Roma, Italy;

²Dipartimento di Biologia, Università "Roma Tre", Viale G. Marconi 446, 00146 Roma, Italy.

Introduzione. All'interno del Phylum degli Ascomiceti il genere *Candida* rappresenta l'agente patogeno più comunemente diffuso e associato a un quadro diversificato di patologie umane. Recentemente, l'incidenza di infezioni fungine ha subito un incremento considerevole legato ad AIDS, trapianti, trattamenti antineoplastici, utilizzo prolungato di cateteri vascolari. La diagnosi di candidosi rimane tuttora attuale, sia per la complessità della diagnosi clinica che per la difficoltà di una corretta identificazione di alcune specie. Riportiamo i risultati di un metodo, basato sulla divergenza della regione D2 del gene codificante la LSU ribosomale, per la identificazione molecolare di asco- e basidiomiceti da campioni clinici.

Metodi. Un gruppo di 39 isolati fungini clinici, affiancati da 14 ceppi di riferimento, sono stati identificati seguendo uno schema operativo standard, dal piastramento al referto, sia mediante saggi fenotipici (RapID e API 20C AUX) che attraverso il metodo di genotipizzazione, utilizzando un approccio di PCR/sequenziamento diretto della regione nucleotidica D2. Le sequenze ottenute sono state caratterizzate mediante interrogazione incrociata di banche dati (GenBank e EMBL) ed il potere discriminatorio del locus D2 nell'assegnazione di specie è stato verificato mediante un'analisi filogenetica comparativa che ha incluso le regioni D1/D2 e D2 della LSU.

Risultati. La risoluzione di specie è stata raggiunta per tutti gli isolati di *Candida* spp. e per generi correlati, nonostante il basso potere discriminatorio del locus D2 prescelto. I risultati sono stati confermati da un'analisi filogenetica che ha convalidato l'accuratezza dell'identificazione anche nei casi di fallimento dell'identificazione fenotipica.

Conclusioni. Il protocollo di identificazione genotipica qui presentato si è rivelato valido nell'identificazione veloce e a basso costo di specie fungine. Combinata a saggi fenotipici preliminari, la identificazione su base genetica può migliorare le procedure utilizzate nell'assegnazione tassonomica di specie fungine di rilevante importanza clinica.

186

PRESENZA DI *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* IN CAMPIONI AUTOPTICI CEREBRALI

Cazzavillan S.¹, Segala C.¹, Bevilacqua PA.¹, Bonoldi E.¹, d'Amore EGS.¹, Rattu M.²

¹U.O. Anatomia Patologica,

²U.O. Microbiologia e Virologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italia.

Introduzione. *Chlamydomphila pneumoniae* (CP) causa infezioni respiratorie, ma è correlata anche allo sviluppo di aterosclerosi e malattie neurodegenerative. Esperimenti "in vitro" hanno evidenziato che l'infezione da CP induce la migrazione delle cellule infettate (Polimorfonucleati) attraverso la barriera emato-encefalica determinando modificazione dell'espressione di molecole di adesione ed alterazione dei meccanismi di trasporto. In questo studio viene valutata la presenza del DNA ed RNA di CP in tessuti cerebrali post-mortem per mezzo di 4 diverse tecniche.

Metodi. Sono stati esaminati campioni autoptici di corteccia cerebrale temporale in 19 pz (13M/6F, età media 61, tutti positivi per CP a livello vascolare); causa di morte embolia polmonare (4), malattie cardiovascolari (4), dissezione aortica (1), IMA (13) ed emorragia cerebrale e da 4 pazienti giovani deceduti per trauma (2M/2F, età media 19a). Sono state usate tecniche di PCR (gene ompA- nested), immunistochemica (IHC) (anticorpo RR402 vs proteina MOMP), PCR in situ ed RT-PCR in situ (gene e trascritto ompA - single step) e sequenza (ABI PRIMS 310 Genetic Analyzer, CA, USA). Come controllo sono state usate cellule HEP-2 infettate da CP in coltura.

Risultati. CP era presente in IHC e PCR in situ in 16 su 19 campioni, e in 14 su 19 mediante RT-PCR in situ e PCR; I controlli erano tutti negativi. L'analisi di sequenza ha confermato il gene ompA di CP (Bal-16 TWAR183).

Conclusioni. Nel nostro studio in 16 su 19 campioni cerebrali è riscontrabile il DNA di CP, in 14 su 19 l'RNA indice di espressione o di vitalità di CP. I nostri dati suggeriscono che il riscontro di CP potrebbe essere associato a una infezione cronica a cui potrebbero essere legate, a lungo termine, situazioni di neuroinfiammazione e sviluppo di patologie neurodegenerative. Ulteriori dati in vitro ed in vivo sono necessari per confermare questa ipotesi.

187

INTERAZIONE FRA DNA BATTERICO E MEMBRANE PER EMODIALISI: UN MODELLO "IN VITRO"

Cazzavillan S.¹, Ratanarat R.³, de Cal M.³, Zoppelletto M.², Grillone R.³, Corradi V.³, d'Amore EGS.¹, Ronco C.³, Rattu M.²

¹U.O. Anatomia Patologica,

²U.O. Microbiologia e Virologia,

³U.O. Nefrologia, Ospedale San Bortolo, Via Rodolfi 36100 Vicenza, Italia.

Introduzione. I pazienti dializzati con patologia renale presentano una situazione infiammatoria cronica che contribui-