

re un archivio consultabile di profili elettroforetici dei principali sierotipi di Salmonella circolanti in Europa, iii) di tipizzare in tempo reale un gran numero di ceppi in ciascun Paese usando criteri di selezione che rendano massimo il potere di rilevazione degli episodi epidemici, iv) di analizzare continuamente i dati nell'archivio on line, infine v) di stabilire un controllo di qualità esterno per la PFGE.

I profili elettroforetici di circa 10000 ceppi di Salmonella responsabili di infezioni umane, appartenenti a diversi sierotipi e isolati in anni diversi, sono stati ottenuti nei diversi centri partecipanti al progetto ed inviati al centro di coordinamento presso l'HPA di Colindale, dove sono stati elaborati mediante un software dedicato (Bionumerics) ed inseriti in un archivio elettronico. I risultati finora ottenuti hanno permesso di classificare 1500 ceppi di *S. enteritidis* in 29 profili elettroforetici e 1300 ceppi di *S. typhimurium* in oltre 60 profili. L'analisi ha consentito inoltre di valutare la capacità discriminante della PFGE all'interno dei diversi tipi fagici e la distribuzione dei profili elettroforetici per area geografica.

I controlli di qualità esterni (che hanno luogo ogni 6 mesi) hanno mostrato che è possibile riprodurre i risultati a livello dei diversi centri partecipanti e di trasferire elettronicamente le informazioni ad un archivio centrale.

Per la tipizzazione in tempo reale, ceppi di recente isolamento e appartenenti ai sierotipi e fagotipi prevalenti, vengono tipizzati mediante PFGE nei diversi centri europei ed inviati settimanalmente insieme alle informazioni epidemiologiche al centro di coordinamento che provvede alla gestione del database europeo.

Il confronto dei profili elettroforetici di ceppi responsabili di focolai epidemici di salmonellosi nei diversi Paesi della UE, insieme ad altri dati di tipizzazione e alle informazioni epidemiologiche fornirà una solida base per l'introduzione di appropriate strategie di intervento.

S2.5

PNEUMOCOCCO MULTIRESISTENTE: LA TIPIZZAZIONE GENOTIPICA COME METODO TRACCIANTE I PRINCIPALI CLONI

Dicuonzo G., Pantosti A.

Università Campus Biomedico e Istituto Superiore di Sanità, Roma

Dalla fine degli anni 80 sono comparsi e si sono rapidamente diffusi ceppi di pneumococco che presentano resistenza alla penicillina e ad altri antibiotici, soprattutto ai macrolidi. La resistenza in pneumococco è generalmente dovuta a trasmissione orizzontale di

materiale genetico, per trasformazione o per coniugazione, mediante trasposoni coniugativi. Un ceppo resistente possiede caratteristiche vantaggiose per la sopravvivenza, per cui può essere selezionato positivamente nell'ambiente in cui si trova, e la sua progenie può espandersi dando origine ad un clone. Una caratteristica importante dei cloni multiresistenti è che la selezione può essere effettuata da uno solo degli antibiotici ai quali è resistente. Il riconoscimento dei cloni, delle loro caratteristiche e della loro diffusione è quindi estremamente importante per comprendere le dinamiche dell'antibiotico-resistenza in una determinata popolazione o area geografica. La tipizzazione fenotipica mediante il sierotipo capsulare rappresenta il dato di base per la descrizione di un clone; la sua utilità però è limitata in quanto uno stesso sierotipo può comprendere diversi cloni, e nell'ambito di un clone possono avvenire cambiamenti ("switch") capsulari. La tipizzazione genotipica, invece, basata su caratteristiche dell'intero genoma o sulla sequenza di geni particolari, è in grado di fornire in maniera univoca una "impronta digitale" del ceppo. Per il pneumococco il "gold standard" è rappresentato dai profili di macrorestrizione del DNA ottenuti mediante elettroforesi in campo pulsato, mediante i quali si ottiene un'ottima discriminazione tra i ceppi ed il confronto è relativamente facile. Recentemente è stata sviluppata una metodica basata sulle sequenze di 7 geni che codificano per alleli di enzimi metabolici denominata Multilocus Sequence Type (MLST). Grazie ad un programma accessibile in Internet (<http://spneumoniae.mlst.net>), è possibile attribuire un numero a ciascuna sequenza allelica di ciascun gene. Il profilo allelico del ceppo determina il sequence type (ST) e può essere confrontato con quello di ceppi isolati in diverse parti del mondo presenti nella banca dati del sito. Ad oggi vi sono più di 800 ST ottenuti dai ceppi esaminati. Sempre utilizzando gli strumenti del sito, è possibile costruire un albero filogenetico che tiene conto delle distanze tra i vari ceppi e suggerisce rapporti clonali ed evoluzione di cloni. Applicando questi metodi abbiamo studiato ceppi di pneumococco provenienti da malattie invasive isolati in varie aree geografiche italiane. Abbiamo accertato che nel nostro paese sono presenti ceppi appartenenti a cloni internazionali antibiotico-resistenti, che sono diffusi in molti paesi europei quale il clone penicillino-resistente France/Spain^{9V}-3, il clone penicillino-sensibile eritromicino-resistente England¹⁴-9, e un clone di sierotipo 6B penicillino-sensibile ma multiresistente diffuso in diversi paesi dell'area mediterranea. Abbiamo anche individuato nel nostro paese un clone originariamente apparso in Svezia come penicillino-sensibile e come sierotipo 15A (il clone Sweden^{15A}-25), che nel nostro paese è presente con ceppi intermedi alla penicillina e appartenenti sia al sierotipo 15A che con switch capsulare al sierotipo 19A. Infine, abbiamo individuato un clone nuovo, che non era stato descritto in precedenza, multiresistente ed appartenente ad un

sierotipo poco comune, il sierotipo 24F, responsabile di casi di meningite a Napoli.

S2.6

LA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE NELLE INFEZIONI DA MICOBATTERI TUBERCOLARI

Cirillo D.M.

SC Microbiologia, AO San Giovanni Battista - Torino

La tubercolosi costituisce un importante problema di salute pubblica in tutto il mondo, non solo nei paesi in via di sviluppo ove i tassi di incidenza sono epidemici, ma anche nei paesi industrializzati, soprattutto in popolazioni a rischio come i soggetti immunocompromessi e gli immigrati. L'epidemiologia molecolare rappresenta un nuovo ed irrinunciabile strumento nella lotta alla malattia tubercolare. La genotipizzazione degli isolati di *M. tuberculosis* permette di delinearne il percorso interumano con importanti ricadute in termini di sorveglianza della dinamica diffusiva della malattia. Dal punto di vista metodologico l'analisi dei polimorfismi di restrizione della sequenza IS6110 (RFLP-IS6110) rappresenta la metodica di riferimento per la tipizzazione degli isolati di *M. tuberculosis*. Tale tecnica, per la sua complessità permette un'analisi dei dati con mesi di ritardo dalla raccolta del campione. Tecnica alternativa per quei ceppi con poche sequenze inserzionali IS6110 è l'elettroforesi in campo pulsato dopo digestione del genoma con enzimi di restrizione. Anch'essa richiede la crescita di micobatteri tubercolari in alte quantità. Pertanto uno degli orientamenti attuali è rappresentato dalla valutazione di metodiche in amplificazione, più rapide ed applicabili anche a minime quantità di DNA. A tale scopo sono state proposte tecniche che utilizzano come target le sequenze inserzionali IS6110 (LM-PCR, mixed-linker PCR) o sequenze differenti (spoligotyping). Il potere discriminatorio di tali metodiche si è rivelato però inferiore all'RFLP-IS6110, che resta a tutt'oggi il "gold standard" per la genotipizzazione di *M. tuberculosis*. La Haeminested Inverse PCR (HIP), basata sulla amplificazione di sequenze che fiancheggiano l'IS6110 e la VNTR-MIRU che si basa sui variable number tandem repeats (VNTR) di elementi definiti mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) si sono dimostrate promettenti sia per il potere discriminatorio sia per la semplicità di esecuzione. Un secondo aspetto applicativo delle metodiche di genotipizzazione rapida potrebbe essere rappresentato dalla possibilità di operare direttamente sul campione clinico, fornendo in tempo pressoché reale notizie importanti dal punto di vista clinico ed epidemiologico. Sino ad ora esistono studi in letteratura riguardanti solamente lo spoligoty-

ping, che presenta però il limite di essere una metodica relativamente poco discriminante e quindi di limitata utilità. Sicuramente la messa a punto e la validazione di protocolli operativi riguardanti in questo ambito altre metodiche rapide potrebbe rappresentare un netto salto di qualità metodologico degli studi di epidemiologia.

S2.7

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI BACILLUS ANTHRACIS

Carattoli A.¹, Oggioni M.R.²

¹ *Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità-Roma;*

² *Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena - Siena*

In accordo con le linee guida internazionali (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) e nazionali (Istituto Superiore di Sanità, ISS), la diagnosi microbiologica di *Bacillus anthracis* è organizzata in livelli progressivi di accertamento e conferma. Nel caso di sospetto isolamento di *B. anthracis*, il ceppo viene analizzato per la conferma definitiva da un laboratorio di riferimento nazionale. Durante l'attacco bioterroristico negli USA, in Italia sono state elaborate linee guida per il potenziamento diagnostico di agenti patogeni potenzialmente utilizzabili a scopo bioterroristico ed è stata creata una rete di laboratori di riferimento in grado di fornire una diagnosi definitiva ed eventualmente una tipizzazione molecolare dei ceppi isolati. In questo ambito, il gruppo di lavoro sul bioterrorismo ISS in collaborazione con l'Università di Siena ha messo a punto metodi molecolari basati sull'amplificazione per PCR ed ibridazione con sonde specifiche (Real-time PCR) per il riconoscimento e la caratterizzazione di *B. anthracis*. In particolare, è stato messo a punto un protocollo diagnostico basato sulla rilevazione diretta di spore di *B. anthracis* nei tamponi nasali, mediante arricchimento in brodo, sterilizzazione in autoclave e rilevazione di geni specifici per Real-time PCR. Sono state disegnate due coppie di primer utili all'identificazione definitiva di *B. anthracis*: una sul gene *lef* del plasmide pX01 ed una sul gene cromosomale *rpoB*. Inoltre, una sonda disegnata sul gene *lef* (*lefC* probe) permette di distinguere il ceppo Sterne (ceppo vaccinale veterinario), usato nel nostro protocollo come controllo positivo dai ceppi selvatici isolati in Italia e dal ceppo Florida isolato negli USA dal primo caso di antrace polmonare nel 2001. La sonda disegnata sul gene *rpoB* distingue il *B. anthracis* da altre specie del genere *Bacillus*, compreso il *B. cereus*. Per la tipizzazione dei ceppi di *B. anthracis* sono state messe a punto tecniche di amplificazione e sequenzia-