

51% ed il 77% dei ceppi NUD e UP rispettivamente, era positivo per *cagA*, mentre una *cagPAI* integra era presente nel 45% e 68% dei ceppi NUD e UP, rispettivamente. In 14 pazienti erano presenti contemporaneamente ceppi *cagPAI* negativi e positivi, ma in 6 di questi ultimi mancavano uno o più geni della *cagPAI*. Delezioni in geni della *cagPAI* erano anche presenti in altri 8 ceppi. In totale, il 12% (10/84) dei pazienti NUD ed il 9% (4/47) dei UP presentavano ceppi contenenti delezioni nel *cagPAI*. Il gene *cagM* si è dimostrato il marker più preciso della presenza di una *cagPAI* integra. Sebbene *cagA* mancava in 5 ceppi NUD *cagPAI*-positivi, questo gene è stato più utile della intera *cagPAI* nella discriminazione di pazienti a maggior rischio di PUD. Nella nostra popolazione, *cagA*, *cagPAI* integra, ed il genotipo *vacA s1* di HP sono associati ad un elevato rischio di UP.

G067

LA NOSTRA ESPERIENZA NELLA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI MICOBATTERI: "INNO-LIPA MYCOBACTERIA" E "MYC-TE ABANALITICA."

Morelli S.¹, Ferri M², Nanetti A.¹.

¹Dip. Med. Clin. Spec. e Sper. Sez. Microbiologia Università di Bologna,

²U.O. Microbiologia - Azienda Ospedaliera S. Orsola Bologna.

Introduzione: visto l'elevato incremento delle infezioni da *Tuberculosis complex* e la comparsa di micobatteri non tubercolari *MOTT* in parte dovuta all'aumento dei pazienti immunodepressi ed in parte ancora di dubbio significato clinico, abbiamo avuto la necessità di introdurre nella pratica quotidiana l'uso di tecnologie molecolari sia per ridurre i tempi di refertazione, sia per identificare in maniera "univoca" queste "nuove" specie.

Materiali e metodi: dal 2001 abbiamo adottato nella routine la tipizzazione molecolare dei micobatteri con Inno-Lipa Innogenetics (PCR della regione ribosomiale 16S-23S rRNA e successiva ibridazione con sonde a sequenza specifica) parallelamente alle colture classiche allestite in terreno solido e liquido, con una significativa riduzione nei tempi di refertazione. In alcuni casi però non siamo riusciti ad andare oltre all'identificazione del genere *Mycobacterium* nemmeno con l'uso della versione Inno-Lipa V2 arricchita in sonde specifiche, quindi ci siamo avvicinati ad una metodica per noi nuova che potesse compensare le nostre "lacune": la MYC-TE Abanalitica che utilizza prima una PCR di una regione del gene *p65* (proteina di 65KD) e poi una digestione combinata di 2 RLFP. L'interpretazione avviene con migrazione dei frammenti in gel di agarosio al 3%. Nello specifico sono stati valutati tre ceppi non identificabili con Inno-Lipa, e per verificare la soggettività o meno delle valutazioni dopo corsa elettroforetica abbiamo fatto interpretare i patterns di reazione ottenuti a due diversi operatori.

Risultati: il campione 1 è stato tipizzato in modo concorde come *Myc. flavescens*, il 2 come *Myc. genevense* mentre il terzo ha dato pareri contrastanti: *Myc. kansasii* in un caso e *Myc. avium* nell'altro. A parere nostro solo la prima valutazione è accettabile poiché quella specie non è identificabile dalle sonde contenute in INNO-LIPA, mentre le altre due assolutamente no perché sia nel caso di *Myc. genevense* che del gruppo *Myc. avium-kansasii* ne avremmo avuto riscontro in INNO-LIPA V2.

Conclusioni: pur considerando le tecniche molecolari come assolutamente fondamentali nella pratica quotidiana sia per la rapidità dei risultati forniti che per la loro sensibilità e spe-

cificità, riteniamo che a tutt'oggi non possano sostituire in maniera totale i test tradizionali, ma se usate come complemento a questi sono un elemento fondamentale in particolare per anticipare significativamente i tempi di refertazione ed andare meglio incontro a quelle che sono le esigenze del clinico.

G068

FATTIBILITÀ DI UN SISTEMA DI TIPIZZAZIONE DI *C. JEJUNI* BASATO SULLE MUTAZIONI DEL GENE *GYRA*

Minelli F. Dionisi A.M., Carattoli A., Luzzi I.

Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299 00161 Roma

Campylobacter possiede antigeni capsulari termolabili, antigeni flagellari e antigeni somatici termostabili, che permettono una sua differenziazione in diversi sierotipi. La sierotipizzazione costituisce uno strumento epidemiologico importante dal momento che solo alcuni sierotipi sembrano correlati a diarreie invasive gravi con complicanze neurologiche, ma sfortunatamente gli antisieri non sono ancora disponibili in commercio.

La tipizzazione molecolare rappresenta un'ulteriore metodo di indagine utile, anche se non applicabile a livello dei laboratori di microbiologia clinica, per approfondire tutti quegli aspetti epidemiologici relativi al riconoscimento delle fonti di infezione, alle vie di trasmissione e al riconoscimento di specifici fattori di rischio di infezione da *Campylobacter*.

In un lavoro precedente abbiamo osservato che le diverse combinazioni di mutazioni in un tratto del gene *gyrA* (coinvolto nella resistenza ai fluorochinoloni) permettevano di raggruppare ceppi *C. jejuni* di diversa origine. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare la fattibilità di uno schema di tipizzazione basato sulle mutazioni del gene *gyrA*. Dieci ceppi rappresentativi di cinque raggruppamenti sono stati utilizzati per ottenere sieri iperimmuni in topo. I sieri sono stati saggiati mediante Western Blot verso l'LPS dei ceppi omologhi, di ceppi appartenenti allo stesso ed ad altri raggruppamenti.

I nostri risultati preliminari hanno dimostrato che tutti i sieri specifici hanno un'alta reattività verso l'LPS del ceppo omologo e verso quelli appartenenti allo stesso raggruppamento, mentre non si osservano cross-reazioni verso altri raggruppamenti.

Questo studio potrebbe rappresentare un valido approccio per lo sviluppo di una metodica di tipizzazione (Western Blot, Elisa) facilmente eseguibile in laboratori di primo livello.

G069

UTILIZZO DI SEQUENZE GENICHE SPECIE-SPECIFICHE PER DIFFERENZIARE *MYCOBACTERIUM BOVIS* DA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

Paglia M.G., De Mori P., Pucillo L.P.

Laboratorio di analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia - Sezione di Microbiologia Molecolare. I.N.M.I. L. Spallanzani, I.R.C.C.S., Roma.

Nel 1995 Rodriguez (1) ha identificato e caratterizzato un frammento di 500 bp nel genoma di *M. bovis*, la cui amplificazione è stata utilizzata per l'identificazione specie-specifica

ca di *M. bovis*. Nel 1996 Scorpio (2) ha descritto il gene *pncA*, coinvolto nella sensibilità alla pirazinamide. Tutti i ceppi di *M. bovis* fino ad oggi saggiati presentano la stessa mutazione puntiforme (169_{c→g}) in questo gene, non documentata in *M. tuberculosis*. Sfruttando il polimorfismo nucleotidico nel gene *pncA*, è stata utilizzata una PCR allele-specifica per differenziare *M. bovis* da *M. tuberculosis*.

Scopo del lavoro. Verificare la specificità dei due metodi sottoponendo a PCR per il frammento da 500 bp di *M. bovis* e per il frammento da 185 bp del gene *pncA* di *M. tuberculosis* DNA estratti da differenti materiali biologici positivi per *M. tuberculosis* e da isolati clinici di *M. tuberculosis*.

Materiali e metodi. Il DNA è stato estratto da 46 differenti campioni biologici e da 10 isolati clinici di *M. tuberculosis*. *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv sono stati utilizzati per mettere a punto delle due PCR e definirne la sensibilità.

Risultati. Le PCR hanno rivelato la presenza di 10 pg di DNA cromosomale, corrispondente a circa 2000 genomi. *M. bovis* BCG è risultato caratterizzato dalla banda attesa di 500 bp, mentre tutti i campioni biologici sono risultati negativi. *M. tuberculosis* H37Rv è risultato caratterizzato dalla banda attesa di 185 bp, così pure 20/46 (43.4%) campioni biologici e i 10 isolati clinici. Inoltre 4/10 di questi isolati (40%) erano caratterizzati da un secondo prodotto di 500 bp, simile a quello ottenuto amplificando il DNA di *M. bovis* BCG.

Conclusioni. La PCR per *M. bovis*, quando utilizzata su isolato, consente di identificare correttamente tale micobatterio. Poiché alcuni isolati clinici di *M. tuberculosis* hanno conservato la sequenza di 500 bp nel proprio genoma, per una corretta identificazione di specie sembra opportuno introdurre come secondo marcatore il gene *pncA*.

G070

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI LEGIONELLA MEDIANTE AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO CON ELETTROFORESI CAPILLARE.

Paglia M.G., Festa A., Frigiotti D., Nebuloso E., Pucillo L.P.

Laboratorio di analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia-Sezione di Microbiologia Molecolare, I.N.M.I. "L. Spallanzani", IRCCS, Roma.

La polmonite è la manifestazione più frequente nell'infezione da *Legionella*, più spesso causata da *L. pneumophila* sierogruppo 1 e 6. Le indagini microbiologiche che ordinariamente prevedono l'isolamento in coltura, la determinazione diretta di antigeni, la documentazione della risposta sierologica, difettano nella capacità di individuare tutte le specie di *Legionella*. Le tecniche di biologia molecolare, di contro, consentono una più rapida ed affidabile diagnosi.

Scopo del lavoro. Determinare la presenza, tramite PCR, del DNA di *Legionella* spp. in campioni biologici diversi di pazienti con polmonite atipica ed applicare un sistema di sequenziamento automatico ad un tratto del gene 16S rRNA al fine di definire la specie di *Legionella*.

Materiali e Metodi. Il DNA batterico di 53 campioni biologici (15 urine, 15 sieri, 22 campioni respiratori, 1 biopsia polmonare) è stato estratto con metodo Qiagen. Un tratto del gene 16S rRNA è stato amplificato, secondo Jonas D. et al. (1995). L'analisi della sequenza nucleotidica del prodotto di amplificazione è stata eseguita dopo purificazione facendo uso di "terminatori" marcati con sostanze fluorescenti mediante il "Big Dye Terminator Sequencing kit v. 3.0" (Applied Biosystem). Gli amplificati così ottenuti sono stati analizzati con il sistema ABI-PRISM 3100. I dati relativi alle sequenze nucleotidiche sono stati confrontati con le sequen-

ze depositate in banca dati.

Risultati. Alla PCR per *Legionella* spp sono risultati positivi 11/53 campioni: 1 urina, 2 sieri, 8 campioni respiratori. Gli amplificati analizzati sono stati identificati correttamente ed a ciascuna specie è stata attribuita una sequenza unica. L'analisi delle sequenze ha consentito di identificare 9 ceppi di *L. pneumophila* e 2 ceppi di *L. bozemanii*.

Conclusioni. Il sequenziamento mediante elettroforesi capillare di un tratto del gene 16S rRNA di *Legionella* spp è un metodo rapido e riproducibile che ha permesso di ampliare la potenzialità identificativa di specie diverse di *Legionella*, utilizzando DNA direttamente estratto da campioni biologici.

G071

ENTEROCOCCHI VANCOMICINA-RESISTENTI ISOLATI DAL SANGUE NEL PERIODO 2001-2002: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Stampone L., Fokas S., D'Ancona F., Salmaso S., Pantosti A., Del Grosso M.

Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, 00161 Roma

Obiettivo di questo lavoro è stato caratterizzare ceppi di enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) isolati dal sangue in pazienti ricoverati in ospedali di diverse aree italiane nel periodo 2001-2002 nell'ambito della sorveglianza nazionale sull'antibiotico resistenza AR-ISS. La caratterizzazione prevedeva una PCR multipla per rilevare i geni delle ligasi specie-specifiche e dei determinanti di resistenza alla vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanCI/2*). Le sensibilità agli antibiotici sono state saggiate mediante microdiluizione in brodo usando il pannello Sensititre. Per analizzare le relazioni clonali fra i ceppi, sono stati ottenuti i profili del DNA genomico digerito con *SmaI* mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE). Sono stati caratterizzati 25 ceppi di VRE isolati in 12 differenti laboratori. La PCR multipla ha confermato che 21 ceppi appartenevano alla specie *E. faecium* e 4 alla specie *E. faecalis*. Tutti, tranne uno, portavano il gene *vanA*, mentre un ceppo di *E. faecium* portava il gene *vanB*. La sensibilità agli antibiotici eseguita su 21 VRE *E. faecium* mostrava che tutti i ceppi erano resistenti all'ampicillina, la maggioranza erano anche resistenti ad alti livelli di streptomina (20/21) e gentamicina (19/21). Il ceppo *vanB*-positivo è risultato sensibile sia alla streptomina che alla gentamicina. Cinque ceppi erano resistenti alla tetraciclina e uno al quinupristin-dalfopristin. La genotipizzazione mediante PFGE ha dimostrato che la maggioranza degli isolati aveva profili molto simili, differendo fra di loro per un numero di bande compreso tra 1 e 4. In conclusione, in Italia come nel resto d'Europa la maggioranza dei VRE appartengono alla specie *E. faecium* e portano il gene *vanA*. Per la prima volta nel nostro paese è stata rilevata la presenza di un isolato portatore del gene *vanB*. Dall'analisi genotipica si può ipotizzare una origine clonale dei ceppi VRE *E. faecium* circolanti in diversi ospedali e aree italiane.