

comunicazioni orali

SESSIONE I

Epidemiologia molecolare in microbiologia

Mercoledì 3 ottobre 2007, ore 09.00 - 13.00, SALA BLU

CO1.1

METODO RAPIDO PER IDENTIFICARE I CEPPI DI CMV RESISTENTI AL GANCICLOVIR.

Alice T.¹; Cerutti F.¹; Varetto S.¹; Pittaluga F.¹; Giliberto G.¹; Mantelli S.¹; Lazzarotto T.²; Ghisetti V.¹

¹ S.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino, c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

² Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Ospedale S.Orsola Malpighi, Bologna

Introduzione. Un problema associato all'introduzione di misure di profilassi e di terapia precoce dell'infezione da CMV (basate sulla somministrazione prolungata di antivirali come ganciclovir (GCV) per via endovenosa e più recentemente per os), è dato dallo sviluppo di ceppi resistenti a GCV. Il 90% delle mutazioni che determinano la resistenza a GCV interessano il gene UL97 che codifica per la fosfotransferasi virale. E' importante ottenere dati rapidi sulla resistenza di CMV per poter scegliere un farmaco alternativo. Il nostro lavoro illustra un protocollo rapido di sequenziamento diretto, per l'identificazione di ceppi farmacoresistenti a partire direttamente dal sangue intero dei pazienti.

Metodi. Sono stati studiati 55 campioni di sangue intero, provenienti da 13 pazienti trapiantati di organo solido (n=7) e midollo allogenico (n=6), con infezione da CMV, che dopo periodi prolungati di pre-emptive therapy con GCV (una media di 8 settimane), avevano mostrato un innalzamento significativo dei valori di pp65 e CMV DNA.

Il protocollo di ricerca dei ceppi di CMV-resistenti a GCV prevede una reazione nested-PCR, per l'amplificazione della regione UL97 (dal codone 439 a 641) di CMV, sequenziamento diretto della regione amplificata seguito da analisi delle sequenze e confronto con

sequenza di riferimento AD169.

Risultati. La sensibilità del protocollo è di 30 copie di genomi/reazione. 5/13 pazienti presentavano mutazioni nel gene UL97; in 3 pazienti queste erano associate a resistenza al GCV (M460V, A594V e L595S); 2 pazienti presentavano mutazioni con incerto impatto di resistenza (1 Q449K e 1 C603F); un solo paziente presentava una mutazione silente (L447F).

Conclusione. Il protocollo sviluppato permette di identificare la presenza di ceppi di CMV resistenti al GCV, in tempi rapidi e con una buona sensibilità.

CO1.2

PRESENZA DEL PAPILOMAVIRUS (HPV) AD ALTO RISCHIO ONCOGENO IN UN CANCRO DELLA LARINGE E IN UNA METASTASI.

Giannattasio A.¹, Panetti G.², Fierro P.², Falco E.¹, Smeraglia R.³, Ingala F.¹

¹Virologia-P.O.Ascalesi - ASLNa1 - Napoli;

²Otorinolaringoiatria - P.O Ascalesi - ASLNa - Napoli;

³Microbiologia e Virologia - A.O.R.N. Monaldi - Napoli.

Introduzione. Diversi studi hanno dimostrato una relazione tra il Papillomavirus (HPV) e le lesioni benigne e/o maligne del cavo orale. Il nostro gruppo ha rilevato la presenza di un HPV ad alto rischio oncogenico sia in un cancro della laringe che in una metastasi linfonodale colliquata dello stesso soggetto.

Metodi. il DNA è stato estratto da tessuto paraffinato proveniente dal carcinoma laringeo e dal tessuto metastatico. Successivamente è stata amplificata la regione L1 (450bp) del genoma virale di HPV, utilizzando i consensus primers MY9/11. I prodotti della PCR sono stati rilevati su gel di agarosio e genotipizzati mediante ibridazione inversa su micropiastra (Nanogen spa).

Risultati. I prodotti della PCR hanno rivelato la presenza in entrambi i tessuti di HPV. Nel caso della laringe si tratta di un HPV 18, mentre nel tessuto metastatico la genotipizzazione ha mostrato la presenza di una coinfezione HPV 16-31-45.

Conclusioni. I risultati ottenuti da un lato confermano il probabile nesso causale tra HPV e lesioni del cavo orale e, dall'altro sembrerebbero dimostrare che questo virus è presente anche in tessuti diversi dagli epitelii e le mucose.

CO1.3

EVOLUZIONE DELLE ESBL IN ITALIA: DIFFUSIONE DI UN CEPPO DI KLEBSIELLA PNEUMONIAE CTX-M-15 E MULTI-RESISTENTE

**Mugnaioli C.¹, Bassano M.², Brecciaroli F.³,
Frontini P.⁴, Ghiandoni M.G.⁵, Migalli A.⁶,
Verna G.⁴, Manso E.⁴, Rossolini G.M.¹**

¹Dipartimento di Biologia Molecolare,
Università degli Studi di Siena.

²Ospedale di San Severino Marche.

³Ospedale di Jesi.

⁴Laboratorio di Microbiologia degli Ospedali Riuniti di Ancona.

⁵Ospedale di Fano.

⁶Ospedale di Senigallia.

Introduzione. Le β -lattamasi a spettro-esteso (ESBL) svolgono nelle *Enterobacteriaceae* un ruolo cruciale come determinanti di resistenza alle cefalosporine a spettro esteso. Recentemente le ESBL del tipo CTX-M si sono rapidamente diffuse in diversi ambienti. La diffusione a livello italiano di questi enzimi in *Escherichia coli* è risultata notevole (54,8% dei produttori di ESBL) mentre in *Klebsiella pneumoniae* la loro prevalenza è molto più limitata (12,3% dei produttori di ESBL). In questo lavoro abbiamo descritto la rapida diffusione a livello regionale di un ceppo multi-resistente (MDR) di *K.pneumoniae* produttore di CTX-M-15.

Metodi. La chemiosensibilità è stata analizzata come raccomandato dal CLSI. La clonalità degli isolati è stata stabilita attraverso RAPD. I determinanti ESBL sono stati rilevati per mezzo della PCR e sequenziamento degli ampliconi. Il trasferimento dei geni di resistenza è stato saggiato attraverso esperimenti di coniugazione. La caratterizzazione plasmidica è stata effettuata attraverso l'analisi RFLP.

Risultati. Durante il periodo ottobre 2005 - giugno 2006, 65 isolati di *K.pneumoniae* consecutivi nonreplacati, ESBL positivi e con un fenotipo MDR (resistenza ai β -lattamici eccetto i carbapenemi, agli aminoglicosidi ed ai fluorochinoloni), sono stati inviati al Laboratorio di Clinica Microbiologia regionale della

regione Marche da otto diversi ospedali. La maggior parte degli isolati proveniva dai reparti di rianimazione, mentre una minoranza da quelli di medicina e chirurgia. L'analisi RAPD ha stabilito la relazione clonale fra gli isolati, che sono risultati tutti positivi per la presenza del gene *bla*_{CTX-M-15}. *Bla*_{CTX-M-15}, codificato da un plasmide coniugativo, è stato efficientemente trasferito in *E.coli* (frequenza di coniugazione nell'ordine di 10⁴ transconiugante per ricevente). Attraverso l'analisi RFLP, i plasmidi codificanti per il gene *bla*_{CTX-M-15} sono risultati apparentemente uguali in tutti gli isolati.

Conclusioni. I risultati di questo studio hanno sottolineato l'abilità di diffusione che può avere un clone di *K.pneumoniae* MDR, che ha acquisito un determinante di resistenza CTX-M-15.