

146

### COAMPLIFICAZIONE DELLE REGIONI 5'UTR E CORE DI HCV E RIDEFINIZIONE DEL GENOTIPO: RISULTATI CLINICO-TERAPEUTICI

Pegoraro F., Alliod S., Montanera P.G., Falcone P.

ASL Valle d'Aosta S.C. Microbiologia, Via G. Rey 5, I I 100 Aosta

**Introduzione.** Il confronto di numerosi isolati di HCV ha permesso di dimostrare l'esistenza di gruppi di virus che presentano un livello di divergenza tra le loro sequenze genomiche pari al 35% circa (genotipi). Sono stati identificati 6 genotipi virali principali che si suddividono a loro volta in sottotipi con livelli di divergenza inferiori e pari a circa il 20%.

L'infezione di tipo 1b si associa più frequentemente a forme gravi di malattia, quali la cirrosi e il tumore, sia per una maggiore aggressività del virus sia per un effetto "coorte" e cioè una maggiore persistenza del virus in circolo, seppure sottoposta a terapia antivirale. La coamplificazione della regione al 5'UTR e core consente la discriminazione tra i due sottotipi 1a ed 1b e anche la variante 6cl.

**Metodi.** Sono stati analizzati 40 campioni di genotipo 1 indeterminato. Il plasma dei campioni conservato a -70°C è stato sottoposto ad estrazione dell'RNA utilizzando il kit Ampliprep di Roche e successivamente amplificato con il kit Versant HCV Amplificazione 2.0 di Siemens su termal cycler AB2400. L'amplificato è stato conservato a -20°C ed il genotipo è stato determinato con il kit Versant HCV genotipo 2.0 di Siemens.

**Risultati.** Tutti i 40 campioni analizzati sono stati correttamente discriminati nel sottotipo, in particolar modo il 95% è risultato appartenente al genotipo 1a ed il restante 5% all'1b.

**Conclusioni.** Una definizione immediata e precisa del genotipo consente l'applicazione di protocolli terapeutici più mirati evitando la somministrazione di dosi maggiori e per tempi prolungati di interferone e ribavirina, sempre in accordo con i dati clinici e citologici. I pazienti con genotipo 1 indeterminato vengono infatti preventivamente sottoposti a protocollo terapeutico per genotipo 1b considerato più aggressivo e farmaco-resistente. Ne consegue che tale determinazione migliora l'appropriatezza terapeutica, a favore del paziente, ed evita il consumo inappropriato di farmaco.

147

### PSEUDOMONAS AERUGINOSA E METALLO- $\beta$ -LATTAMASI IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA: PREVALENZA E PERSISTENZA

Pollini S.<sup>1</sup>, Mugnaioli C.<sup>1</sup>, Campana S.<sup>2</sup>, Ravenni N.<sup>2</sup>, Neri A.S.<sup>2</sup>, Taccetti G.<sup>2</sup> e Rossolini G.M.<sup>1</sup><sup>1</sup>Sezione di Microbiologia, Dip. di Biologia Molecolare, Università di Siena, Italia.<sup>2</sup>Centro Fibrosi Cistica, Dip. di Pediatria, Università di Firenze, Italia.

**Introduzione.** L'acquisizione e la diffusione in isolati di *Pseudomonas aeruginosa* delle metallo- $\beta$ -lattamasi (MBL) rappresenta una notevole problematica in ambito clinico; isolati produttori di MBL sono stati descritti in epidemie ospedaliere, ma le conoscenze sulla loro diffusione in pazienti con Fibrosi Cistica (FC) risultano ancora limitate. Lo scopo del lavoro è stato quello di studiare la prevalenza delle MBL in ceppi di *P.aeruginosa* da FC, e di analizzare la persistenza nel tempo, la clonalità dei ceppi MBL-positivi ed il contesto genico dei determinanti di resistenza.

**Metodi.** 44 ceppi di *P.aeruginosa* resistenti ai carbapenemi, provenienti da 39 pazienti cronicamente colonizzati in cura presso il Centro FC di Firenze, sono stati analizzati per la produzione di MBL attraverso E-test e saggi spettrofotometrici. I geni MBL sono stati analizzati mediante ibridazione, PCR e sequenziamento del DNA. In caso di positività per MBL, sono stati analizzati gli isolati retrospettivi dallo stesso paziente. La clonalità dei ceppi MBL-positivi è stata analizzata mediante genotipizzazione (RAPD/PFGE).

**Risultati.** La produzione di MBL è stata rilevata in 2 dei 44 (5%) isolati, provenienti da 2 differenti pazienti. Gli isolati MBL-positivi possedevano due distinte varianti del gene *bla<sub>VIM</sub>*, identificate come *bla<sub>VIM-1</sub>* e *bla<sub>VIM-2</sub>*. L'analisi degli isolati retrospettivi dei due pazienti ha mostrato la persistenza dei determinanti *bla<sub>VIM-1</sub>* e *bla<sub>VIM-2</sub>* per sei e otto anni rispettivamente. L'analisi genotipica ha stabilito la clonalità degli isolati *bla<sub>VIM-2</sub>*-positivi mentre gli isolati *bla<sub>VIM-1</sub>*-positivi mostravano una maggiore variabilità genetica. Le due varianti geniche sono risultate parte di due distinti integroni di classe 1.

**Conclusioni.** Due varianti del gene *bla<sub>VIM</sub>* sono state isolate in ceppi di *P.aeruginosa* da pazienti con FC cronicamente colonizzati. La diffusione di geni MBL in *P.aeruginosa* da pazienti con FC è un fenomeno allarmante che può avere importanti implicazioni di tipo terapeutico.

**Si ringrazia la Fondazione Fibrosi Cistica per il suo contributo (FFC#14/2006).**