

175

CONFRONTO TRA SDA E REAL-TIME PCR NELLA DIAGNOSTICA DELLA INFEZIONE DA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*: STUDIO PRELIMINARE

¹Di Taranto A., ²Del Prete R., ¹De Nittis R., ¹Antonetti R.,
²Miragliotta G.

¹Laboratorio di Microbiologia,
Azienda Ospedaliera-Universitaria OORR, Viale Pinto, 71100-Foggia
²Sezione di Microbiologia, Dip. MIDIM, Università degli Studi,
Policlinico, P.zza G. Cesare, 4, 70124-Bari.

Introduzione. *Chlamydia trachomatis* è attualmente responsabile di una delle infezioni a trasmissione sessuale (STD) più diffuse. Nel sesso femminile la sua prevalenza cade nell'età compresa tra 18 e 24 anni e nel 70-80% dei casi decorre in maniera paucisintomatica. Ciò implica sottostima della diffusione reale della infezione e possibile evoluzione in Malattia Infiammatoria Pelvica (PID) con conseguenti sterilità e gravidanze ectopiche. L'introduzione in diagnostica dei NAATs (Nucleic Acid Amplification Tests) hanno permesso di controllare la diffusione della infezione. Scopo del nostro lavoro è quello di confrontare due metodiche di amplificazione genica, Strand Displacement Amplification (SDA) e Real-Time PCR, su campioni provenienti da popolazione di sesso femminile e maschile.

Materiali e Metodi. Dal 1° Settembre al 30 Novembre 2005 sono stati esaminati 67 campioni clinici di cui 59 tamponi endocervicali (8 da gravide) e 8 urine (da sesso maschile) provenienti da pazienti ambulatoriali (1 tampone endocervicale da pz. ricoverata) di età compresa tra 22 e 58 anni afferenti all'ambulatorio di Microbiologia degli OO.RR. Foggia per sintomatologia riferibile a infezione delle vie uro-genitali. I campioni clinici sono stati saggiati contemporaneamente con metodiche molecolari, SDA (Becton & Dickinson, BD, USA) e Real-Time PCR (RealArt™ *C. trachomatis* Plus, Artus-Biotech, Germany) dopo estrazione del DNA mediante sistema automatizzato (Qiagen, Germany).

Risultati. 3/59 tamponi endocervicali sono risultati positivi sia a SDA sia a Real-Time PCR. 1/8 campioni urinari provenienti dal sesso maschile, è risultato positivo sia a SDA sia a Real-Time PCR. 7/8 campioni urinari sono risultati indeterminati a SDA e negativi a Real-Time PCR.

Conclusioni. I dati preliminari ci permettono di affermare che la Real-Time PCR dimostra avere una notevole precisione diagnostica sia come tecnica di screening sia nella conferma della infezione da *Chlamydia trachomatis*. Inoltre, i risultati indeterminati ottenuti dalla tecnica SDA potrebbero essere dovuti all'utilizzazione delle urine che, per la presenza di inibitori, sono considerati campioni "difficili".

176

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ISOLATI IN ITALIA

Filetici E., Owczarek S., Luzzi I., Dionisi A.M.

Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

Introduzione. *Yersinia enterocolitica* è l'unica specie del

genere *Yersinia* responsabile di gastroenteriti nell'uomo; è ampiamente diffusa in natura e il principale serbatoio è rappresentato dai suini; l'infezione viene prevalentemente contratta attraverso il consumo di carni suine contaminate ed è di tipo sporadico, anche se non mancano descrizioni di episodi epidemici. La maggior parte dei ceppi isolati da fonte non umana risultano non tipizzabili ed è necessario utilizzare tecniche di tipizzazione molecolare che consentano lo studio del DNA.

La frequenza di isolamento di *Y. enterocolitica* in casi umani di gastroenterite in Italia è piuttosto bassa, tuttavia il microrganismo viene ricercato e ritrovato frequentemente negli alimenti di origine animale e nei vegetali. Scopo della nostra ricerca è stato quello di analizzare ceppi di *Y. enterocolitica* isolati da diverse fonti mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE), al fine di verificare la capacità discriminante di questa tecnica e di creare una collezione di profili elettroforetici di ceppi attualmente circolanti nel nostro Paese.

Metodi. Sono stati analizzati 70 ceppi di *Y. enterocolitica* isolati da alimento, da animale, da uomo negli anni 2004-2005. Su tutti i ceppi è stata eseguita sierotipizzazione, determinazione della sensibilità agli antibiotici e PFGE.

Risultati. L'analisi mediante PFGE ha prodotto 66 profili elettroforetici diversi per 69 ceppi non correlati epidemiologicamente (potere discriminante > 98%) rilevando profili diversi anche all'interno dello stesso sierotipo. Solo per 2 ceppi isolati da infezione umana correlati temporalmente e geograficamente sono stati ottenuti profili elettroforetici identici.

Conclusioni. La PFGE si dimostra una tecnica di tipizzazione valida anche per *Y. enterocolitica* utilizzabile a supporto degli studi epidemiologici; è inoltre uno strumento di tipizzazione indispensabile per i ceppi non sierotipizzabili isolati da varie fonti alimentari di cui ancora è sconosciuto il ruolo nelle infezioni umane.

177

METODI MOLECOLARI A CONFRONTO PER LA TIPIZZAZIONE DI HCV-RNA

Gabella S., Alice T.; Varetto S., Pittaluga F., Ghisetti V.,
Marchiaro G.

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

Introduzione. La tipizzazione di HCV ha valore prognostico in quanto predice la risposta alla terapia ma anche epidemiologico perché consente di valutare la diffusione del virus fornendo uno strumento importante per il controllo di cluster epidemici a livello nosocomiale. Scopo di questo lavoro è valutare il ruolo del sequenziamento diretto di regioni genomiche diversamente variabili di HCV per la tipizzazione di HCV a livello di genotipo e in particolare di sottotipo. Il sequenziamento viene confrontato con il test di ibridazione inversa line-probe-assay (LiPA).

Metodi. 70 campioni di siero da pazienti HCV-positivi e appartenenti ai genotipi 1-5 secondo LiPA sono stati sottoposti al sequenziamento diretto della regione genomica 5'UTR (5'UTR-Seq). Su 21 campioni (12 5'UTR-Seq-negativi) si è proceduto al sequenziamento diretto della regione NS5b (NS5b-Seq). Per l'analisi filogenetica sono state selezionate sequenze di riferimento rispettivamente per le regio-

ni 5'UTR (n=71) e NS5b (n=30); BioEdit 7.0.0 e ClustalW sono stati utilizzati per l'allineamento delle sequenze dei campioni con quelle di riferimento.

Risultati. 5'UTR-Seq ha consentito di tipizzare il 66% (46/70) dei campioni LiPA-positivi. Dal confronto 5'UTR-Seq *versus* LiPA, 40 campioni su 46 (87%) sono risultati concordanti per genotipo e 32 su 40 (80%) concordanti per sottotipo. Dei 12 campioni 5'UTR-Seq-negativi, 8 sono stati tipizzati mediante NS5b-Seq. Tutti i genotipi individuati con NS5b-Seq sono risultati concordanti con quelli ottenuti con LiPA. Il sequenziamento delle regioni 5'UTR e NS5b ha consentito l'attribuzione di un unico sottotipo nei casi in cui LiPA non consentiva la determinazione del sottotipo, come per i genotipi 1,2 e 4. L'utilizzo combinato del sequenziamento di 5'UTR e NS5b ha permesso di tipizzare l'81% dei campioni LiPA-positivi.

Conclusioni. Questo studio evidenzia la necessità di utilizzare il sequenziamento diretto di almeno due regioni genomiche con differente livello di variabilità genetica per la tipizzazione del virus a scopo epidemiologico e clinico.

178

CASI DI AMEBIASI A PARMA NEL PERIODO 2003-2006

Calderaro A., Gorrini C., Piccolo G., Peruzzi S.,
Bommezzadri S., Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio,
Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma.

Introduzione. L'identificazione di *Entamoeba histolytica*, agente eziologico di amebiasi, è importante per una corretta diagnosi e una terapia mirata. *E. histolytica* non è morfologicamente differenziabile da *E. dispar*, non patogena; pertanto, sono necessari metodi molecolari per distinguerle. Nel presente studio riportiamo i casi di amebiasi e di infezione da *E. dispar* diagnosticati nel nostro laboratorio nel periodo 2003-2006 mediante metodi molecolari (PCR convenzionale e real-time) affiancati a quelli tradizionali.

Metodi. I campioni di feci (5647) e/o liquido aspirato da ascesso epatico (11) (appartenenti a 1886 pazienti con sospetta parassitosi intestinale) sono stati sottoposti ad esame macroscopico, microscopico ed esame colturale per protozoi e nematodi intestinali. Dai campioni appartenenti a pazienti che presentavano sospetto clinico e/o fattori di rischio per amebiasi è stato inoltre estratto il DNA e sottoposto a PCR (convenzionale e real-time) per l'identificazione di *E. histolytica* e *E. dispar*.

Risultati. Nel periodo 2003-2006 sono stati diagnosticati nel nostro laboratorio 18 casi (0.95%) di infezione da *E. dispar* e 10 casi (0.53%) di amebiasi (5 di amebiasi extraintestinale e 5 di dissenteria amebica).

Discussione. L'applicazione dei saggi di PCR, affiancati ai metodi tradizionali, si è rivelata indispensabile per una diagnosi accurata consentendo di instaurare prontamente una terapia mirata nei 5 pazienti con amebiasi extraintestinale, evitando un decorso clinico infausto. I saggi di PCR si sono rivelati più sensibili e specifici dei metodi tradizionali: in mancanza dei saggi molecolari, 5 dei 10 casi di amebiasi non sarebbero stati diagnosticati poiché negativi alle indagini tradizionali. Inoltre, i saggi di PCR si sono dimostrati utili per ottenere informazioni riguardanti l'epidemiologia delle infezioni da *E. histolytica* in un paese non endemico quale

l'Italia, permettendoci di comprendere come l'amebiasi non sia limitata a soggetti immigrati, adottati o che abbiano viaggiato in zone endemiche, ma sia presente anche in italiani apparentemente privi di fattori di rischio.

179

CONFRONTO TRA I METODI TRADIZIONALI FENOTIPICI ED IL SEQUENZIAMENTO DEL GENE 16S rRNA PER L'IDENTIFICAZIONE DEI BATTERI

Arosio M., Raglio A., Nozza F., Vailati F., Passera M., Grigis A.,
Goglio A.

USC Microbiologia e Virologia,
A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo, Largo Barozzi 1, 24128 Bergamo

Introduzione. Lo scopo del presente lavoro è stato di valutare, nella realtà di un laboratorio ospedaliero di Microbiologia, la performance e le indicazioni all'identificazione dei microrganismi tramite sequenziamento del genoma batterico in confronto ai tradizionali metodi fenotipici.

Metodi. Nella nostra routine diagnostica le metodiche adottate prevedono la colorazione al Gram e le indagini manuali e/o automatizzate (gallerie API - VITEK 2, *bioMerieux*). L'esame molecolare è stato effettuato utilizzando il Kit MicroSeq 500 (*Applied Biosystems*), eseguendo la fase di estrazione, amplificazione tramite PCR e sequenziamento del gene 16S rRNA, in accordo alle indicazioni della ditta. Per l'identificazione delle sequenze è stato utilizzato il database di GenBank (BLAST) confrontando in alcuni casi i risultati ottenuti con quelli del MicroSeq ID Analysis Software (*Applied Biosystems*). Un'identità della sequenza 16S rRNA >99% è stato il criterio adottato per identificare un isolato a livello di specie e tra 97-99% a livello di genere.

Risultati. Sono stati esaminati 75 microrganismi: 23 bacilli Gram negativi non fermentanti, 5 stafilococchi, 20 streptococchi α -emolitici, 2 enterococchi, 4 esigenti, 9 vari, 9 micobatteri e 3 miceti, isolati da campioni biologici che presentavano difficoltà all'identificazione con i metodi tradizionali. Si è giunti ad una identificazione di specie in 67 casi (89.3%) con il kit MicroSeq 500 e soltanto in 31 (41.3%) con le metodiche convenzionali (X^2 , $p<0.05$) ai quali si aggiungono 27 isolati (36%) che hanno riportato un'identificazione di genere mentre 17 (22.7%) nessuna identificazione. In 8 casi (10.7%) è stato possibile trovare soltanto un'omologia delle sequenze che soddisfacesse i criteri per l'identificazione di genere. I nostri dati mostrano inoltre una performance inferiore nei confronti degli streptococchi α -emolitici per quanto significativamente più elevata dei sistemi tradizionali (75% vs 40%).

Conclusioni. Il sequenziamento del gene 16S rRNA ha permesso una corretta e rapida identificazione della maggior parte dei microrganismi isolati (89.3%). L'utilizzo del software riduce ulteriormente i tempi di identificazione, confrontando direttamente le sequenze in esame all'interno di un database controllato anche se meno completo di quello disponibile nelle banche dati pubbliche come GenBank. La recente disponibilità del kit MicroSeq FullGene (1500 bp) potrebbe migliorare la performance di questa procedura. Un aspetto non trascurabile sono i costi contenuti del kit MicroSeq 500 che lo rende facilmente applicabile nei laboratori di Microbiologia con esperienza nell'utilizzo delle indagini molecolari.