

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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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.