

appartenenti al gruppo gN-4 rappresenterebbero fenotipi maggiormente virulenti. In particolare il gN-4b ed il gN-4c risulterebbero prognostici di manifestazioni cliniche severe dell'infezione da HCMV.

Conclusioni. Gli studi presentati dimostrano come in ambito clinico, nonché nella pratica per la sicurezza del trapianto e trasfusionale, possa risultare importante identificare non solo la presenza del genoma virale, ma anche il ceppo virale di appartenenza, informazione a valore prognostico nel corso del monitoraggio diagnostico e terapeutico del paziente con infezione da HCMV.

185

IDENTIFICAZIONE DI *CANDIDA* SPP. E GRUPPI TASSONOMICI CORRELATI MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DELLA REGIONE D2 DEL GENE CODIFICANTE LA LSU RIBOSOMALE

Putignani L.¹, Paglia M.G.¹, Bordi E.¹, Nebuloso E.¹, Pucillo L.P.¹, Visca P.^{1,2}

¹Unità di Microbiologia Molecolare, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive I.R.C.C.S. "Lazzaro Spallanzani", Via Portuense 292, 00149 Roma, Italy;

²Dipartimento di Biologia, Università "Roma Tre", Viale G. Marconi 446, 00146 Roma, Italy.

Introduzione. All'interno del Phylum degli Ascomyceti il genere *Candida* rappresenta l'agente patogeno più comunemente diffuso e associato a un quadro diversificato di patologie umane. Recentemente, l'incidenza di infezioni fungine ha subito un incremento considerevole legato ad AIDS, trapianti, trattamenti antineoplastici, utilizzo prolungato di cateteri vascolari. La diagnosi di candidosi rimane tuttora attuale, sia per la complessità della diagnosi clinica che per la difficoltà di una corretta identificazione di alcune specie. Riportiamo i risultati di un metodo, basato sulla divergenza della regione D2 del gene codificante la LSU ribosomale, per la identificazione molecolare di asco- e basidiomiceti da campioni clinici.

Metodi. Un gruppo di 39 isolati fungini clinici, affiancati da 14 ceppi di riferimento, sono stati identificati seguendo uno schema operativo standard, dal piastramento al referto, sia mediante saggi fenotipici (RapID e API 20C AUX) che attraverso il metodo di genotipizzazione, utilizzando un approccio di PCR/sequenziamento diretto della regione nucleotidica D2. Le sequenze ottenute sono state caratterizzate mediante interrogazione incrociata di banche dati (GenBank e EMBL) ed il potere discriminatorio del locus D2 nell'assegnazione di specie è stato verificato mediante un'analisi filogenetica comparativa che ha incluso le regioni D1/D2 e D2 della LSU.

Risultati. La risoluzione di specie è stata raggiunta per tutti gli isolati di *Candida* spp. e per generi correlati, nonostante il basso potere discriminatorio del locus D2 prescelto. I risultati sono stati confermati da un'analisi filogenetica che ha convalidato l'accuratezza dell'identificazione anche nei casi di fallimento dell'identificazione fenotipica.

Conclusioni. Il protocollo di identificazione genotipica qui presentato si è rivelato valido nell'identificazione veloce e a basso costo di specie fungine. Combinata a saggi fenotipici preliminari, la identificazione su base genetica può migliorare le procedure utilizzate nell'assegnazione tassonomica di specie fungine di rilevante importanza clinica.

186

PRESENZA DI *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* IN CAMPIONI AUTOPTICI CEREBRALI

Cazzavillan S.¹, Segala C.¹, Bevilacqua PA.¹, Bonoldi E.¹, d'Amore EGS.¹, Rattu M.²

¹U.O. Anatomia Patologica,

²U.O. Microbiologia e Virologia, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italia.

Introduzione. *Chlamydomphila pneumoniae* (CP) causa infezioni respiratorie, ma è correlata anche allo sviluppo di aterosclerosi e malattie neurodegenerative. Esperimenti "in vitro" hanno evidenziato che l'infezione da CP induce la migrazione delle cellule infettate (Polimorfonucleati) attraverso la barriera emato-encefalica determinando modificazione dell'espressione di molecole di adesione ed alterazione dei meccanismi di trasporto. In questo studio viene valutata la presenza del DNA ed RNA di CP in tessuti cerebrali post-mortem per mezzo di 4 diverse tecniche.

Metodi. Sono stati esaminati campioni autoptici di corteccia cerebrale temporale in 19 pz (13M/6F, età media 61, tutti positivi per CP a livello vascolare); causa di morte embolia polmonare (4), malattie cardiovascolari (4), dissezione aortica (1), IMA (13) ed emorragia cerebrale e da 4 pazienti giovani deceduti per trauma (2M/2F, età media 19a). Sono state usate tecniche di PCR (gene ompA- nested), immunistochemica (IHC) (anticorpo RR402 vs proteina MOMP), PCR in situ ed RT-PCR in situ (gene e trascritto ompA - single step) e sequenza (ABI PRIMS 310 Genetic Analyzer, CA, USA). Come controllo sono state usate cellule HEP-2 infettate da CP in coltura.

Risultati. CP era presente in IHC e PCR in situ in 16 su 19 campioni, e in 14 su 19 mediante RT-PCR in situ e PCR; I controlli erano tutti negativi. L'analisi di sequenza ha confermato il gene ompA di CP (Bal-16 TWAR183).

Conclusioni. Nel nostro studio in 16 su 19 campioni cerebrali è riscontrabile il DNA di CP, in 14 su 19 l'RNA indice di espressione o di vitalità di CP. I nostri dati suggeriscono che il riscontro di CP potrebbe essere associato a una infezione cronica a cui potrebbero essere legate, a lungo termine, situazioni di neuroinfiammazione e sviluppo di patologie neurodegenerative. Ulteriori dati in vitro ed in vivo sono necessari per confermare questa ipotesi.

187

INTERAZIONE FRA DNA BATTERICO E MEMBRANE PER EMODIALISI: UN MODELLO "IN VITRO"

Cazzavillan S.¹, Ratanarat R.³, de Cal M.³, Zoppelletto M.², Grillone R.³, Corradi V.³, d'Amore EGS.¹, Ronco C.³, Rattu M.²

¹U.O. Anatomia Patologica,

²U.O. Microbiologia e Virologia,

³U.O. Nefrologia, Ospedale San Bortolo, Via Rodolfi 36100 Vicenza, Italia.

Introduzione. I pazienti dializzati con patologia renale presentano una situazione infiammatoria cronica che contribui-

scie ad aumentare di circa 10 volte il rischio cardiovascolare rispetto alla popolazione normale. Studi recenti hanno dimostrato che piccoli frammenti di DNA batterico attraversano le membrane da emodialisi determinando infiammazione. Poichè i diversi biomateriali di cui sono composti i filtri da dialisi possono comportarsi in modo diverso nei confronti del DNA batterico (bdNA) abbiamo sviluppato un modello "in vitro" studiando il comportamento di 5 specifiche membrane biocompatibili da dialisi.

Metodi. In una apparecchiatura sperimentale per emodialisi, è stato fatto ricircolare sangue eparinato inoculato con *Paeruginosa* (150CFU/ml). Come controllo di infezione è stata effettuata una emocoltura dopo 5 e 60 min dall'inoculo. Al termine dell'esperienza il filtro è stato lavato con 2 L di fisiologica e gli ultimi 100 ml sono stati coltivati. Dal compartimento del sangue (BL) e del dialisato (DIA) è stato estratto separatamente il DNA, ed è stato ricercato il DNA codificante per 16SrRNA (bdNA) mediante PCR. L'amplificato è stato sequenziato per conferma.

Risultati. I risultati sono riportati in tabella. La presenza di bdNA è stata evidenziata in tutti i filtri mediante metodo molecolare, nonostante l'emocoltura degli ultimi 100 ml di fisiologica di lavaggio fosse negativa, e l'analisi di sequenza ha confermato i risultati. Nonostante l'inoculo nel sangue, il DNA di *Paeruginosa* è stato riscontrato anche nel DIA. I risultati sono paragonabili per tutti i filtri studiati.

Conclusioni. Dai dati ottenuti si può ipotizzare che i filtri agiscono da concentratori nei confronti del bdNA e che il bdNA può attraversare le membrane dei filtri. Dal momento che il bdNA è caratterizzato dalla presenza di strutture particolari che attivano il sistema immunitario umano con produzione di citochine proinfiammatorie, la sua presenza nel BL potrebbe spiegare l'infiammazione quando non attribuibile ad altre cause cliniche note.

Filtro da emodialisi	Emocoltura			100 ml fisiologica finale	bdNA	
	Pre	5 min	60 min		Comp. sangue	Comp. dialisato
Fx100	Neg	+	+	Neg	+	+
Polyflux 210H	Neg	+	+	Neg	+	+
Nephral ST500	Neg	+	+	Neg	+	+
Filtrizer BK2.1F	Neg	+	+	Neg	+	+
Sureflux 190E	Neg	+	+	Neg	+	+

188

QUATTRO ANNI DI ATTIVITÀ PER L'ANTIBIOTICO-SENSIBILITÀ DI MTC

Santoro G., Falca M., Polidoro L. Russo F.

UOC Microbiologia e Virologia
Direttore Prof. Riccardo Smeraglia
A.O. Monaldi Via L.Bianchi Napoli

Introduzione. Nel 2002 abbiamo introdotto nel nostro laboratorio accanto al test di sensibilità in medium solido, Lowenstein-Jensen antibiotato, allestito secondo il metodo delle proporzioni (MOP), il test di antibiotico-sensibilità in medium liquido su ceppi del complesso *Mycobacterium tuberculosis*. Il nostro scopo è stato quello di ridurre i tempi di esecuzione dell'antibiogramma da 28 a 4-13 giorni. Inoltre, nel 2004, con l'introduzione del test Inno-LiPA

Rif.TB abbiamo rilevato, in tempi ancor più contenuti, la resistenza a RMP con l'analisi del genotipo.

Metodi. Kit BACTEC MGIT 960 SIRE della Becton Dickinson. Test di sensibilità (MOP) su Lowenstein-Jensen antibiotato della DASIT. Sistema INNO-LiPA Rif. TB della INNOGENETICS per la rilevazione della resistenza genotipica a RMP.

Risultati. Nel 2002 abbiamo affiancato SIRE e MOP su tutti i campioni; nel successivo anno tale protocollo è stato riservato solo ai pazienti di primo accesso mentre il monitoraggio dei pazienti a controllo veniva effettuato solo con SIRE e, all'insorgenza, le nuove resistenze confermate anche con il MOP. Successivamente abbiamo introdotto il test di genotipizzazione sui ceppi fenotipicamente resistenti a RMN. In media, per ogni anno, abbiamo allestito circa 90 tests di antibiotico-sensibilità, relativi ad altrettanti pazienti. I risultati di tali tests ci hanno portato alle seguenti percentuali di resistenza, dedotte dai tests in medium liquido, per gli antibiotici in tabella:

	SM	INH	RMP	EMB	PZA
2002	17.7%	25.3 %	8.9 %	3.8 %	NT
2003	11.4 %	24.7 %	9.0 %	3.5 %	4.8 %
2004	31.2 %	26.3 %	17.2 %	6.5 %	9.0 %
2005	17.7 %	22.7 %	11.5 %	6.3%	9.5 %

Tali percentuali risultano sovrapponibili a quelle osservate con i tests in medium solido ad eccezione dell'EMB che esprime percentuali più basse mediamente di 2 punti.

Discussione. L'esperienza acquisita in questi anni nella diagnostica dell'antibiotico-sensibilità, ci consente di abbandonare definitivamente l'uso MOP e di introdurre il test di genotipizzazione direttamente su campioni positivi all'esame microscopico ed all'amplificazione genica per MTC. Ciò consentirà di rilevare la resistenza alla rifampicina e quindi, per la nota associazione con INH, di eventuale ceppo MDR con un anticipo valutabile in circa 4 settimane. Questa informazione per il clinico risulterà di enorme utilità ed a vantaggio del paziente che eviterà l'assunzione di farmaci inadeguati ed il prolungamento del tempo di degenza. Inoltre, in tal modo, è possibile attuare un più stretto controllo sulla diffusione di ceppi MDR ed un contenimento della spesa sanitaria relativa ai costi di una terapia inappropriata ed al prolungamento dei tempi di degenza.

189

UN CASO DI TUBERCOLOSI INTESTINALE SOSTENUTO DA MYCOBACTERIUM GORDONAE DIMOSTRATO MEDIANTE POLYMERASE CHAIN REACTION ED IBRIDAZIONE IN SITU INVERSA

Sarnelli B., Morelli M.L., Abate R., Matrone G., Ingala F.

Laboratorio di Patologia Clinica e Microbiologia
- P.O. "Ascalesi" - Via E. a Forcella 31 - Napoli

Caso Clinico. In una paziente di 46 anni, venuta alla nostra osservazione nel Marzo 2006, l'endoscopia diagnostica evidenziava la presenza di lesioni suggestive di IBD. Durante la colonscopia venivano eseguite biopsie multiple, sia per esame istologico, sia per la ricerca di Micobatteri.

Materiali e Metodi. I campioni biotici sono stati ridotti in aliquote da 25 mg circa. Una parte di queste è stata omogeneizzata in 2 ml di soluzione salina sterile 0.85% ed avviata all'esame colturale; almeno tre aliquote sono state conservate a