

P076**DETERMINAZIONE DI CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN CAMPIONI DI URINE MEDIANTE AMPLIFICAZIONE DI GENI PLASMIDICI**

^Paglia M.G., *Orchi N., ^Frigiotti D., Visca P., ^Pucillo L.P.

*^Laboratorio di analisi Chimico - Cliniche e Microbiologia - Unità di Microbiologia Molecolare, * Dipartimento di Epidemiologia, I.N.M.I. L. Spallanzani, IRCCS, Roma.*

Chlamydia Trachomatis (CT) è un batterio intracellulare obbligato e parassita pressoché esclusivo della specie umana, nella quale provoca una molteplicità di quadri morbosi. In mancanza di terapia o di terapia inadeguata, l'iniziale cervicite nella donna o uretrite nel maschio possono condurre a malattia pelvica nella donna, a prostatite e/o epididimite nel maschio. La diagnosi di laboratorio di CT si avvale: (i) dell'esame colturale; (ii) di metodi diretti per la ricerca dell'antigene; (iii) di test sierologici; (iv) di vari saggi (anche commerciali) di amplificazione genica. I metodi non molecolari si sono dimostrati scarsamente specifici e/o sensibili, oppure esageratamente laboriosi. Le tecniche basate sull'amplificazione del DNA (PCR) possono invece offrire una valida base diagnostica nella individuazione ed identificazione di CT. A tale scopo sono state da noi utilizzate sequenze nucleotidiche specifiche localizzate nel plasmide criptico di CT. Questa scelta è stata fatta per aumentare la sensibilità del nostro sistema d'indagine, ospitando ciascuna cellula batterica circa 10 copie del plasmide.

Scopo. Verificare in soggetti con disturbi urogenitali la presenza di CT quale segno di infezione celata e/o persistente utilizzando campioni di urine.

Materiali e Metodi. Nel corso del 2003 sono stati inseriti nello studio 22 pazienti di età compresa tra 22 e 44 anni, afferenti al servizio CRAIDS. Di questi 13 erano maschi e riferivano sintomi di uretrite, mentre 9 erano femmine con disturbi ginecologici vari, quali bruciore, leucorrea, dolori pelvici. Per valutare la presenza di CT sono stati utilizzati esclusivamente campioni di urine (primo getto). Dopo l'estrazione del DNA batterico (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) è stata allestita una PCR con primers specifici per il plasmide endogeno di CT, caratterizzata da una sensibilità di 0.1 IFU (Inclusion Forming Units).

Risultati e Conclusioni. Quattro (18 %) dei campioni di urine sono risultati positivi, confermandi i dati di prevalenza osservati in individui sintomatici afferenti a centri per le malattie sessualmente trasmesse. Il protocollo di amplificazione applicato in questo studio si è dimostrato estremamente valido nella ricerca del DNA di CT. La possibilità di impiegare urine (anziché campioni ottenuti con procedure invasive) rende attuabile l'utilizzo del saggio in programmi di screening su popolazioni selezionate.

P077**REVISIONE LETTERARIA DI CASI DOCUMENTATI DI TETANO PER STIMARNE INCIDENZA E PREVALENZA DI DAL 1980 AL 2003**

Pecone L.F., Vecchi E.

Università di Modena e Reggio Emilia - Via Campi, 287; tel. 059/2055456 - E-mail lufloren@yahoo.it

Obiettivo: Lo scopo del lavoro è quello di riassumere le

cause di un relativo aumento dell'incidenza del tetano, nonostante l'obbligatorietà mondiale alla vaccinazione.

Il tetano è una patologia infettiva acuta provocata da un bacillo Gram positivo (*Clostridium tetani*) sporigeno anaerobio obbligato, con letalità complessiva di circa il 45%. Si calcola che, attualmente, a livello mondiale si verificano circa un milione di casi di tetano/anno: la maggior parte dei casi riguarda i Paesi in via di sviluppo. Nei paesi industrializzati l'andamento dell'infezione tetanica ha registrato un decremento dell'incidenza a partire dagli anni '50.

In Italia si è verificato tale decremento, ma a partire dal 1995 si nota un aumento delle notifiche in seguito a ferite o escoriazioni lievi, verificatesi a causa di incidenti domestici o di giardinaggio. La fascia di età maggiormente colpita è quella che va da 65 a 69 anni per il sesso maschile e 80-84 anni per quello femminile, le donne risultano più colpite degli uomini. Dalle schede di notifica emerge che nel 97% dei casi vi era assenza di vaccinazione antitetanica, mentre nel 3 % dei soggetti colpiti vi era una vaccinazione incompleta o un richiamo da più di 10 anni al momento del trauma.

Materiali e metodi: Ricerca e consultazione di banche dati bibliografiche on-line e cartacee utilizzando Pubmed e Medline

Risultati. Sono stati trovati 20 studi significativi ed utili allo scopo del presente lavoro. Tutti gli studi confermano che l'età dell'incidenza dell'infezione a seguito di ferite accidentali ed anche le motivazioni riportate rispecchiano, in percentuale, quanto sopra affermato. Solo uno studio condotto sulla popolazione egiziana, pubblicato nel 2002, riporta che in modo significativo, gli uomini (23,7%) risultavano meno protetti delle donne.

Discussione. Molti sono i punti critici e di discussione: innanzitutto, la mancanza di pubblicazione recenti, prova di un disconoscimento dell'argomento e della mancanza di interesse verso una patologia che, sebbene letale, viene oggi trascurata. Poi la carenza di studi che valutino la percentuale di popolazione protetta nei confronti del tetano e di test specifici per valutare la durata della protezione. Molte persone infette presentano un calendario vaccinale incompleto o addirittura assente, oppure non hanno fatto un richiamo dopo 10 anni.

P078**LIVELLI DI S-TETANO IgG IN SOGGETTI CHE ESEGUONO LA VACCINAZIONE ANTITETANICA**Pecone L.F.⁽¹⁾; Vecchi E.⁽¹⁾; Melchionda D.⁽¹⁾; Cagarelli R.⁽²⁾; Errani F.⁽²⁾; Nacci G.⁽²⁾; Ferrari A.⁽²⁾; Lambertini A.⁽²⁾⁽¹⁾Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia⁽²⁾Igiene Pubblica - AUSL di Modena**Obiettivo**

L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare i livelli di protezione contro la tossina del *C. Tetani* e le caratteristiche di popolazione di un gruppo di soggetti presentatisi spontaneamente nel periodo gennaio 2000-dicembre 2002 presso l'ambulatorio vaccinale dell'Igiene Pubblica dell'AUSL di Modena.

Metodi

Di ognuno dei 1.037 soggetti si è raccolto: il consenso, i dati anagrafici (cognome, nome, data e luogo di nascita, età, sesso e nazionalità), data d'esecuzione del prelievo, n. dosi somministrate, n. richiami, completamento o meno del ciclo vaccinale, assolvimento del servizio militare. Si sono poi calcolati: età media dei soggetti e deviazione standard dell'età, limite inferiore e superiore dell'età, frequenza assoluta e relativa del sesso dei soggetti, distribuzione per nazionalità

dei soggetti, flussi mensili degli accessi con distribuzione anche per nazionalità, frequenza assoluta e relativa di completamento e non completamento del ciclo vaccinale, correlazione tra nazionalità e livelli di protezione per tetano, correlazione tra sesso e livelli di protezione per il tetano, correlazione tra classi di età e livelli di protezione per il tetano e correlazione tra assolvimento del servizio militare e livelli di protezione per il tetano (si ricorda che si considerano dosaggi ematici di S-Tetano IgG <0.1UI/ml non protettivi, tra 0.1 e 0.5 protettivi e >0.5 UI/ml immunità di lunga durata). Tutte le correlazioni si sono analizzate utilizzando il chi quadro X^2 .

Risultati

L'età media dei soggetti è di 42 anni e 2 mesi; la deviazione standard dell'età è di 12.91; il limite inferiore dell'età è 20 anni e quello superiore è 89 anni; i maschi sono stati 825 (79.6%) e le femmine 212 (20.4%); gli italiani sono stati 653 (63%) e gli stranieri 384 (37%) in prevalenza albanesi, marocchini, nigeriani, ghanesi, filippini e tunisini; l'anno di maggior afflusso è stato il 2002 con 861 soggetti ed in particolare il mese di settembre 2002 con 111 prelievi effettuati.

Conclusioni

I soggetti stranieri e italiani studiati risultano quasi ugualmente protetti nei confronti del tetano, come dimostrato dall'analisi statistica effettuata con il metodo del chi quadro ($X^2=12.04$; g.l.=2; $p<0.001$) quindi con alta significatività statistica.

Gli uomini sono più protetti rispetto alle donne ($p<0.01$); i soggetti nella classe di età 20-40 anni sono più protetti rispetto a quelli della classi 41-60 e 61-90 ($P<0.01$) e infine i soggetti che hanno assolto il servizio militare sono più protetti rispetto a quelli milite-esente ($p<0.01$).

P079

INCIDENZA DI INFEZIONI URINARIE NEI REPARTI PEDIATRICI DELL'OSPEDALE S.GIOVANNI-ADDOLORATA DI ROMA

Placanica P*, Bormioli Q*, Binello M.*, Recchia O*, Sereno S.**

Laboratorio di Microbiologia
Ospedale S.Giovanni-Addolorata-Roma
** Dip. Mal. Infettive e Tropicali
Università La Sapienza-Roma

Obiettivo: valutare l'incidenza di patogeni urinari nei reparti pediatrici dell'ospedale S.Giovanni-Addolorata di Roma.

Metodo: esame di 360 urinocolture provenienti dai reparti di Nipiologia (99) e Breve Osservazione Pediatrica (PBO) (261) nel periodo ottobre 2002-settembre 2003.

Identificazione degli isolati batterici e studio della sensibilità agli antibiotici mediante sistema automatico Vitek 2 (Biomérieux).

Risultati: il 73.1% dei campioni è risultato negativo, e il 26.9% positivo (97/360). Sono risultati positivi 71/261 (27.2%) campioni in PBO e 26/99 (26.3%) in Nipiologia. La maggior parte degli isolati è costituita da gramnegativi. I grampositivi costituiscono il 5% e i miceti il 3%. Gli isolati prevalenti si riferiscono a *E.Coli* (43.3%), *Proteus mirabilis* (23.7%), *Klebsiella spp.* (13.4%) e *Pseudomonas aeruginosa* (5%). *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas* sono più frequenti nella PBO.

Per quanto riguarda il profilo di sensibilità agli antibiotici, in entrambi i reparti, la maggior parte delle molecole testate appare efficace al 100% in vitro, su gran parte degli isolati, ad eccezione di: ampicillina, piperacillina, amoxicillina/ac. clavulanico, cefalotina, cefoxitina, che, in alcuni casi, mostrano attività parziale o assente.

Conclusioni: la casistica è esigua e non consente valutazio-

ni statistiche ineccepibili, ma costituisce il punto di partenza per il confronto con altri reparti pediatrici ospedalieri e per il controllo della popolazione microbica residente e della sua evoluzione nel tempo, e per il controllo delle resistenze batteriche.

P080

IDENTIFICAZIONE RAPIDA DEI BATTERI ANAEROBI DEL PARODONTO MEDIANTE PYROSEQUENCING

*Orrù G., *Pusceddu G., *Concas D., *Ciusa M.L., *Meroni E., *Montaldo C., *Piras V.

*O.B.L. (Oral Biotechnology Laboratory) Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Università degli Studi di Cagliari.

*BIOSENSE S.r.l. Cinisello Balsamo - MI

Questo lavoro descrive un sistema integrato culturale/molecolare per l'identificazione rapida (96 identificazioni in 5 ore) degli anaerobi presenti nel distretto parodontale umano, molti difficilmente identificabili con i sistemi tradizionali.

Il metodo è basato sul sequenziamento di un corto frammento di una regione ipervariabile del genoma che codifica per il gene 16S rRNA che presenta, per tali batteri, un elevato polimorfismo nucleotidico interspecifico. Sono stati eseguiti prelievi di placca sottogengivale di 20 pazienti (sani e parodontopatici). I campioni sono stati seminati in Columbia agar sangue ed incubati a 37°C per 7 giorni in anaerobiosi.

Il profilo nucleotidico del frammento "target" è stato ottenuto tramite sequenziamento in real time con metodo Pyrosequencing. La metodica ha richiesto: (i) l'amplificazione tramite PCR di un frammento di 286 bp del gene 16S rRNA, utilizzando un primer biotinilato in 5' (ii) la separazione del singolo filamento utilizzando una metodica con supporti a base di streptavidina, (iii) la successiva reazione di sequenziamento col sistema Pyrosequencing (Pyrosequencing AB Uppsala, Sweden). Durante la reazione di sequenza, per ogni base nucleotidica incorporata viene emessa radiazione luminosa (registrata sotto forma di pirogramma,) grazie ad un sistema enzimatico contenente luciferina. È stata creata inoltre una banca dati delle sequenze target mediante programma applicativo Bioedit che consente in tempo reale di identificare la sequenza.

Su 133 colonie analizzate le specie o generi maggiormente rappresentati sono: *Streptococcus constellatus* 25,6%; *Peptostreptococcus micros* 8,3%; *Actinomyces spp.* 7,5%; *Porphyromonas gingivalis* 3,8%; *Gemella spp.* 2,3%; *Clostridium perfringens* 1,5%; *Tannerella forsythensis* 1,5%; *Veillonella spp.* 1,5%; *Capnocytophaga spp.* 1,5%; *Fusobacterium nucleatum* 0,8%; *Selenomonas spp.* 0,8%; *Cardiobacterium spp.* 0,8%; *Microbacterium spp.* 0,8%; *Paenibacillus spp.* 0,8%; *Agrobacterium tumefaciens* 0,8%. I pazienti parodontopatici presentavano un'elevata percentuale delle specie ritenute patogene in bibliografia. Questa metodica può rappresentare un valido supporto al microbiologo nella diagnosi di laboratorio di malattia parodontale.

Ringraziamenti: Dott. Carlo Farachi (BIOSENSE S.r.l.)
Dott. Roberto Usai (DEPECO S.r.l.)