

G064**CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DI CEPPI DI *HELICOBACTER PYLORI* CON L'IMPIEGO DELLE TECNICHE ERIC-PCR E REP-PCR.**

Donati M., Sgarzani C.*, Storni E., Pollini G.M.,
Bandi C.**, Sambri V., Cevenini R.

Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale - Sezione di Microbiologia, Università di Bologna, Policlinico S. Orsola, Bologna, *Servizio di Gastroenterologia, Ospedale S. Maria delle Croci, Ravenna, **Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano.

All'interno della specie *H. pylori* esiste un elevato grado di variabilità genomica. Numerose tecniche di biologia molecolare sono state utilizzate al fine di differenziare i ceppi isolati di *H. pylori*.

Nel presente lavoro è stata eseguita una caratterizzazione genomica di 74 ceppi di *H. pylori* isolati da pazienti sottoposti a gastroduodenoscopia. A tale scopo, sono state impiegate le tecniche ERIC-PCR e REP-PCR.

La metodica ERIC-PCR ha permesso la distinzione dei ceppi di *H. pylori* in due clusters: al primo apparteneva il 47.5% dei ceppi isolati da pazienti con dispepsia non ulcerosa, mentre nel secondo erano compresi in prevalenza (41.2%) ceppi provenienti da pazienti con ulcera e, in più bassa percentuale (29.4%), ceppi isolati da soggetti asintomatici. Una percentuale simile nei due clusters (15% e 14.7% rispettivamente), era rappresentata da ceppi provenienti da pazienti con carcinoma.

Con la tecnica REP-PCR sono stati distinti tre clusters: in uno era raggruppato il 50% dei ceppi isolati dai pazienti dispeptici, mentre erano distribuiti in tutti e tre, con percentuali simili (18.6%, 16.6% e 11.5%), i ceppi provenienti da pazienti con carcinoma. I ceppi isolati da pazienti con ulcera peptica sono stati distribuiti con percentuali simili (37% e 38.5%) in due dei tre clusters.

I dati ottenuti nel presente studio con l'analisi computerizzata dei clusters suggeriscono che, mentre il carcinoma gastrico e la dispepsia non ulcerosa non sembrano essere associati a nessun particolare cluster, gli isolati da quadri di ulcera peptica sono stati associati nel nostro lavoro in un cluster distinto con la ERIC-PCR e in due diversi clusters con la REP-PCR.

L'analisi del genoma dei ceppi di *H. pylori* con l'impiego di una di queste tecniche o di entrambe può essere quindi utile per tipizzare i ceppi di *H. pylori* e per individuare eventuali associazioni tra il loro DNA e patologie ad esso correlate.

G065**RETE ENTER-NET, IL SISTEMA DI SORVEGLIANZA EUROPEO SUGLI ISOLAMENTI DI SALMONELLA RAPPORTO QUADRIENNALE, ITALIA 1999-2002**

Galetta P., Caprioli A., Tozzi A., Arena S., Filetici E., Dionisi A.M., Lana S., Owczarek S., Luzzi I.

Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299
00161 Roma

Le tossinfezioni alimentari sostenute da un patogeno ubiquitario come Salmonella rappresentano un rilevante problema di sanità pubblica per l'elevata morbosità e per la rilevanza

in termini economici, soprattutto in occasione di eventi epidemici. Le misure di profilassi e di controllo delle infezioni trasmesse da alimenti devono affidarsi a solidi sistemi di sorveglianza basati sui laboratori di microbiologia.

Enter-Net è la rete Europea di sorveglianza delle infezioni enteriche che effettua il monitoraggio delle infezioni da Salmonella, *E.coli* O157 ed altri *E.coli* produttori di verocitotossina. La rete è attiva dal 1994 e coinvolge tutti i Paesi dell'Unione Europea. Il coordinamento europeo della rete Enter-Net è presso l'HPA di Colindale. La rete nazionale Enter-Net Italia, coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità, si avvale della partecipazione di laboratori diagnostici che operano nel settore di microbiologia clinica, veterinaria e ambientale.

Negli ultimi quattro anni di attività, la struttura della rete ENTER-NET Italia si è consolidata. L'attività di sorveglianza integrata (isolamenti da uomo, da animali, da alimenti e da ambiente), di tipizzazione, di monitoraggio dell'antibiotico resistenza, ha permesso di conoscere l'ecosistema delle salmonelle italiane, di determinare sierotipi emergenti, di valutare il fenomeno della resistenza multipla agli antibiotici. Questo ha consentito che i dati italiani venissero diffusi e analizzati insieme a quelli degli altri Paesi europei e che venissero identificati e controllati episodi epidemici di tossinfezione alimentare sia di carattere nazionale che transnazionale. Tuttavia, occorre implementare a livello nazionale un rapido flusso di informazioni, migliorare la completezza delle segnalazioni ricevute ed incrementare la copertura geografica che è carente in alcune regioni come è evidenziabile dal confronto tra segnalazioni alla rete Enter-Net e notifiche di salmonellosi.

galetta@iss.it

G066**INTEGRITÀ DELL'ISOLA DI PATOGENICITÀ DI *HELICOBACTER PYLORI* ED ASSOCIAZIONE CON L'ULCERA PEPTICA**

Gomez-Miguel M.J.¹, Petrucci C.¹, Topa S.¹, Benedetti I.¹, Pietroiusti A.², Porowska B.³, Covotta A.⁴, Mascelino M.T.⁵, Luzzi I.¹.

¹Dip. Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma, ²Dip. Medicina Interna, Università "Tor Vergata", Roma, ³Dip. Chirurgia generale "Paride Stefanina", ⁴Dip. Scienze Chirurgiche e Tecnologie Mediche Applicate e ⁵Clinica di Malattie Infettive, Università "La Sapienza", Roma

Due putativi fattori di virulenza di *H. pylori* (HP), l'isola di patogenicità (*cagPAI*) e la tossina vacuolizzante (*vacA*), sono stati associati ad un incremento nel rischio di sviluppare ulcera peptica (UP) o carcinoma gastrico nei soggetti infetti da questo batterio. CagA, una proteina fortemente immunogenica codificata da uno dei geni della *cagPAI*, viene utilizzata come marker della presenza dell'isola, analizzando la risposta serologica specifica dell'ospite e/o la presenza del gene nel batterio. La intensa attività proinfiammatoria dei ceppi *cagPAI*-positivi non è dovuta, però, al *cagA*, ma ad altri geni della *cagPAI*, la cui assenza potrebbe modificare la virulenza del batterio. Scopo del nostro lavoro è stato caratterizzare la diversità genetica del *cag PAI* ed il *vacA* in ceppi di HP, e analizzare la loro associazione con l'UP. Sette geni del *cag PAI* (*cagA*, *cagE*, *cagF*, *cagM*, *cagT*, *cagI3* e *cag6*), l'empty site e le varianti alleliche s/m del *vacA* di 131 ceppi di HP (47 da soggetti con UP e 84 da soggetti con dispepsia non ulcerosa, NUD) sono stati analizzati mediante PCR. Il

51% ed il 77% dei ceppi NUD e UP rispettivamente, era positivo per *cagA*, mentre una *cagPAI* integra era presente nel 45% e 68% dei ceppi NUD e UP, rispettivamente. In 14 pazienti erano presenti contemporaneamente ceppi *cagPAI* negativi e positivi, ma in 6 di questi ultimi mancavano uno o più geni della *cagPAI*. Delezioni in geni della *cagPAI* erano anche presenti in altri 8 ceppi. In totale, il 12% (10/84) dei pazienti NUD ed il 9% (4/47) dei UP presentavano ceppi contenenti delezioni nel *cagPAI*. Il gene *cagM* si è dimostrato il marker più preciso della presenza di una *cagPAI* integra. Sebbene *cagA* mancava in 5 ceppi NUD *cagPAI*-positivi, questo gene è stato più utile della intera *cagPAI* nella discriminazione di pazienti a maggior rischio di PUD. Nella nostra popolazione, *cagA*, *cagPAI* integra, ed il genotipo *vacA s1* di HP sono associati ad un elevato rischio di UP.

G067

LA NOSTRA ESPERIENZA NELLA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI MICOBATTERI: "INNO-LIPA MYCOBACTERIA" E "MYC-TE ABANALITICA."

Morelli S.¹, Ferri M², Nanetti A.¹.

¹Dip. Med. Clin. Spec. e Sper. Sez. Microbiologia Università di Bologna,
²U.O. Microbiologia - Azienda Ospedaliera S. Orsola Bologna.

Introduzione: visto l'elevato incremento delle infezioni da *Tuberculosis complex* e la comparsa di micobatteri non tubercolari *MOTT* in parte dovuta all'aumento dei pazienti immunodepressi ed in parte ancora di dubbio significato clinico, abbiamo avuto la necessità di introdurre nella pratica quotidiana l'uso di tecnologie molecolari sia per ridurre i tempi di refertazione, sia per identificare in maniera "univoca" queste "nuove" specie.

Materiali e metodi: dal 2001 abbiamo adottato nella routine la tipizzazione molecolare dei micobatteri con Inno-Lipa Innogenetics (PCR della regione ribosomiale 16S-23S rRNA e successiva ibridazione con sonde a sequenza specifica) parallelamente alle colture classiche allestite in terreno solido e liquido, con una significativa riduzione nei tempi di refertazione. In alcuni casi però non siamo riusciti ad andare oltre all'identificazione del genere *Mycobacterium* nemmeno con l'uso della versione Inno-Lipa V2 arricchita in sonde specifiche, quindi ci siamo avvicinati ad una metodica per noi nuova che potesse compensare le nostre "lacune": la MYC-TE Abanalitica che utilizza prima una PCR di una regione del gene *p65* (proteina di 65KD) e poi una digestione combinata di 2 RLFP. L'interpretazione avviene con migrazione dei frammenti in gel di agarosio al 3%. Nello specifico sono stati valutati tre ceppi non identificabili con Inno-Lipa, e per verificare la soggettività o meno delle valutazioni dopo corsa elettroforetica abbiamo fatto interpretare i patterns di reazione ottenuti a due diversi operatori.

Risultati: il campione 1 è stato tipizzato in modo concorde come *Myc. flavescens*, il 2 come *Myc. genevense* mentre il terzo ha dato pareri contrastanti: *Myc. kansasii* in un caso e *Myc. avium* nell'altro. A parere nostro solo la prima valutazione è accettabile poiché quella specie non è identificabile dalle sonde contenute in INNO-LIPA, mentre le altre due assolutamente no perché sia nel caso di *Myc. genevense* che del gruppo *Myc. avium-kansasii* ne avremmo avuto riscontro in INNO-LIPA V2.

Conclusioni: pur considerando le tecniche molecolari come assolutamente fondamentali nella pratica quotidiana sia per la rapidità dei risultati forniti che per la loro sensibilità e spe-

cificità, riteniamo che a tutt'oggi non possano sostituire in maniera totale i test tradizionali, ma se usate come complemento a questi sono un elemento fondamentale in particolare per anticipare significativamente i tempi di refertazione ed andare meglio incontro a quelle che sono le esigenze del clinico.

G068

FATTIBILITÀ DI UN SISTEMA DI TIPIZZAZIONE DI *C. JEJUNI* BASATO SULLE MUTAZIONI DEL GENE *GYRA*

Minelli F. Dionisi A.M., Carattoli A., Luzzi I.

Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299 00161 Roma

Campylobacter possiede antigeni capsulari termolabili, antigeni flagellari e antigeni somatici termostabili, che permettono una sua differenziazione in diversi sierotipi. La sierotipizzazione costituisce uno strumento epidemiologico importante dal momento che solo alcuni sierotipi sembrano correlati a diarreie invasive gravi con complicanze neurologiche, ma sfortunatamente gli antisieri non sono ancora disponibili in commercio.

La tipizzazione molecolare rappresenta un'ulteriore metodo di indagine utile, anche se non applicabile a livello dei laboratori di microbiologia clinica, per approfondire tutti quegli aspetti epidemiologici relativi al riconoscimento delle fonti di infezione, alle vie di trasmissione e al riconoscimento di specifici fattori di rischio di infezione da *Campylobacter*.

In un lavoro precedente abbiamo osservato che le diverse combinazioni di mutazioni in un tratto del gene *gyrA* (coinvolto nella resistenza ai fluorochinoloni) permettevano di raggruppare ceppi *C. jejuni* di diversa origine. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare la fattibilità di uno schema di tipizzazione basato sulle mutazioni del gene *gyrA*. Dieci ceppi rappresentativi di cinque raggruppamenti sono stati utilizzati per ottenere sieri iperimmuni in topo. I sieri sono stati saggiati mediante Western Blot verso l'LPS dei ceppi omologhi, di ceppi appartenenti allo stesso ed ad altri raggruppamenti.

I nostri risultati preliminari hanno dimostrato che tutti i sieri specifici hanno un'alta reattività verso l'LPS del ceppo omologo e verso quelli appartenenti allo stesso raggruppamento, mentre non si osservano cross-reazioni verso altri raggruppamenti.

Questo studio potrebbe rappresentare un valido approccio per lo sviluppo di una metodica di tipizzazione (Western Blot, Elisa) facilmente eseguibile in laboratori di primo livello.

G069

UTILIZZO DI SEQUENZE GENICHE SPECIE-SPECIFICHE PER DIFFERENZIARE *MYCOBACTERIUM BOVIS* DA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

Paglia M.G., De Mori P., Pucillo L.P.

Laboratorio di analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia - Sezione di Microbiologia Molecolare. I.N.M.I. L. Spallanzani, I.R.C.C.S., Roma.

Nel 1995 Rodriguez (1) ha identificato e caratterizzato un frammento di 500 bp nel genoma di *M. bovis*, la cui amplificazione è stata utilizzata per l'identificazione specie-specifica-