

ca di *M. bovis*. Nel 1996 Scorpio (2) ha descritto il gene *pncA*, coinvolto nella sensibilità alla pirazinamide. Tutti i ceppi di *M. bovis* fino ad oggi saggiati presentano la stessa mutazione puntiforme (169_{c→g}) in questo gene, non documentata in *M. tuberculosis*. Sfruttando il polimorfismo nucleotidico nel gene *pncA*, è stata utilizzata una PCR allele-specifica per differenziare *M. bovis* da *M. tuberculosis*.

Scopo del lavoro. Verificare la specificità dei due metodi sottoponendo a PCR per il frammento da 500 bp di *M. bovis* e per il frammento da 185 bp del gene *pncA* di *M. tuberculosis* DNA estratti da differenti materiali biologici positivi per *M. tuberculosis* e da isolati clinici di *M. tuberculosis*.

Materiali e metodi. Il DNA è stato estratto da 46 differenti campioni biologici e da 10 isolati clinici di *M. tuberculosis*. *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv sono stati utilizzati per mettere a punto delle due PCR e definirne la sensibilità.

Risultati. Le PCR hanno rivelato la presenza di 10 pg di DNA cromosomale, corrispondente a circa 2000 genomi. *M. bovis* BCG è risultato caratterizzato dalla banda attesa di 500 bp, mentre tutti i campioni biologici sono risultati negativi. *M. tuberculosis* H37Rv è risultato caratterizzato dalla banda attesa di 185 bp, così pure 20/46 (43.4%) campioni biologici e i 10 isolati clinici. Inoltre 4/10 di questi isolati (40%) erano caratterizzati da un secondo prodotto di 500 bp, simile a quello ottenuto amplificando il DNA di *M. bovis* BCG.

Conclusioni. La PCR per *M. bovis*, quando utilizzata su isolato, consente di identificare correttamente tale micobatterio. Poiché alcuni isolati clinici di *M. tuberculosis* hanno conservato la sequenza di 500 bp nel proprio genoma, per una corretta identificazione di specie sembra opportuno introdurre come secondo marcatore il gene *pncA*.

G070

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI LEGIONELLA MEDIANTE AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO CON ELETTROFORESI CAPILLARE.

Paglia M.G., Festa A., Frigiotti D., Nebuloso E., Pucillo L.P.

Laboratorio di analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia-Sezione di Microbiologia Molecolare, I.N.M.I. "L. Spallanzani", IRCCS, Roma.

La polmonite è la manifestazione più frequente nell'infezione da *Legionella*, più spesso causata da *L. pneumophila* sierogruppo 1 e 6. Le indagini microbiologiche che ordinariamente prevedono l'isolamento in coltura, la determinazione diretta di antigeni, la documentazione della risposta sierologica, difettano nella capacità di individuare tutte le specie di *Legionella*. Le tecniche di biologia molecolare, di contro, consentono una più rapida ed affidabile diagnosi.

Scopo del lavoro. Determinare la presenza, tramite PCR, del DNA di *Legionella* spp. in campioni biologici diversi di pazienti con polmonite atipica ed applicare un sistema di sequenziamento automatico ad un tratto del gene 16S rRNA al fine di definire la specie di *Legionella*.

Materiali e Metodi. Il DNA batterico di 53 campioni biologici (15 urine, 15 sieri, 22 campioni respiratori, 1 biopsia polmonare) è stato estratto con metodo Qiagen. Un tratto del gene 16S rRNA è stato amplificato, secondo Jonas D. et al. (1995). L'analisi della sequenza nucleotidica del prodotto di amplificazione è stata eseguita dopo purificazione facendo uso di "terminatori" marcati con sostanze fluorescenti mediante il "Big Dye Terminator Sequencing kit v. 3.0" (Applied Biosystem). Gli amplificati così ottenuti sono stati analizzati con il sistema ABI-PRISM 3100. I dati relativi alle sequenze nucleotidiche sono stati confrontati con le sequen-

ze depositate in banca dati.

Risultati. Alla PCR per *Legionella* spp sono risultati positivi 11/53 campioni: 1 urina, 2 sieri, 8 campioni respiratori. Gli amplificati analizzati sono stati identificati correttamente ed a ciascuna specie è stata attribuita una sequenza unica. L'analisi delle sequenze ha consentito di identificare 9 ceppi di *L. pneumophila* e 2 ceppi di *L. bozemanii*.

Conclusioni. Il sequenziamento mediante elettroforesi capillare di un tratto del gene 16S rRNA di *Legionella* spp è un metodo rapido e riproducibile che ha permesso di ampliare la potenzialità identificativa di specie diverse di *Legionella*, utilizzando DNA direttamente estratto da campioni biologici.

G071

ENTEROCOCCHI VANCOMICINA-RESISTENTI ISOLATI DAL SANGUE NEL PERIODO 2001-2002: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Stampone L., Fokas S., D'Ancona F., Salmaso S., Pantosti A., Del Grosso M.

Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena 299, 00161 Roma

Obiettivo di questo lavoro è stato caratterizzare ceppi di enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) isolati dal sangue in pazienti ricoverati in ospedali di diverse aree italiane nel periodo 2001-2002 nell'ambito della sorveglianza nazionale sull'antibiotico resistenza AR-ISS. La caratterizzazione prevedeva una PCR multipla per rilevare i geni delle ligasi specie-specifiche e dei determinanti di resistenza alla vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanC1/2*). Le sensibilità agli antibiotici sono state saggiate mediante microdiluzione in brodo usando il pannello Sensititre. Per analizzare le relazioni clonali fra i ceppi, sono stati ottenuti i profili del DNA genomico digerito con *SmaI* mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE). Sono stati caratterizzati 25 ceppi di VRE isolati in 12 differenti laboratori. La PCR multipla ha confermato che 21 ceppi appartenevano alla specie *E. faecium* e 4 alla specie *E. faecalis*. Tutti, tranne uno, portavano il gene *vanA*, mentre un ceppo di *E. faecium* portava il gene *vanB*. La sensibilità agli antibiotici eseguita su 21 VRE *E. faecium* mostrava che tutti i ceppi erano resistenti all'ampicillina, la maggioranza erano anche resistenti ad alti livelli di streptomina (20/21) e gentamicina (19/21). Il ceppo *vanB*-positivo è risultato sensibile sia alla streptomina che alla gentamicina. Cinque ceppi erano resistenti alla tetraciclina e uno al quinupristin-dalfopristin. La genotipizzazione mediante PFGE ha dimostrato che la maggioranza degli isolati aveva profili molto simili, differendo fra di loro per un numero di bande compreso tra 1 e 4. In conclusione, in Italia come nel resto d'Europa la maggioranza dei VRE appartengono alla specie *E. faecium* e portano il gene *vanA*. Per la prima volta nel nostro paese è stata rilevata la presenza di un isolato portatore del gene *vanB*. Dall'analisi genotipica si può ipotizzare una origine clonale dei ceppi VRE *E. faecium* circolanti in diversi ospedali e aree italiane.