

29^o Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia

7 - 10 Novembre 2001, Genova



Riassunti

CEPPI DI “*BURKHOLDERIA CEPACIA*” CLINICI ED AMBIENTALI ISOLATI IN ITALIA PRESENTANO DIVERSA DISTRIBUZIONE DEI GENOMOVARS E DEI CARATTERI CORRELATI ALLA PATOGENICITÀ.

G. Manno¹, C. Dalmastrì², S. Tabacchioni², L. Chiarini², M.L. Belli¹, S. Piana¹, A. Materazzo², P. Vandamme³ e A. Bevivino².

¹Lab. Ricerca e Diagnostica Infettivologica Ist. G.Gaslini Genova; ²ENEA Casaccia, Roma; ³University of Gent, Belgium.

Il *Burkholderia cepacia* complex comprende sia ceppi patogeni opportunisti in pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) che ceppi ad alto potenziale biotecnologico in campo agricolo ed ambientale. Al *B. cepacia* complex attualmente appartengono le seguenti specie e genomovars: *B. cepacia* genomovar I, *B. multivorans*, *B. cepacia* genomovar III, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. cepacia* genomovar VI, *B. ambifaria* e *B. pyrrocinia*. L'obiettivo del presente lavoro consiste nell'individuare la distribuzione dei diversi genomovars e specie in ambiente clinico e naturale e chiarire la diffusione di caratteri correlati con virulenza e trasmissibilità. Sono stati analizzati 68 ceppi di *B. cepacia* isolati presso l'Ospedale Gaslini di Genova da 53 pazienti FC residenti in 11 regioni italiane e 75 ceppi ambientali isolati dalla rizosfera di mais in 3 diverse località italiane. I ceppi sono stati assegnati ai rispettivi genomovars e specie mediante analisi RFLP del 16S rDNA e del gene *recA*, ed amplificazione di porzioni genomovar-specifiche del gene *recA*. E' stata quindi valutata la distribuzione dei seguenti caratteri correlati alla virulenza e trasmissibilità: attività proteolitica ed emolitica, suscettibilità a diversi antibiotici e presenza dei geni *esmR* e *cbIA*. E' stata analizzata inoltre l'attività pectinolitica mediante il test di macerazione della cipolla. E' stata evidenziata una diversa distribuzione di specie e genomovars in relazione all'origine degli isolati, con elevata presenza del *B. cepacia* genomovar III sia tra i ceppi clinici che tra quelli ambientali, la presenza di *B. ambifaria* esclusivamente nella rizosfera ed una presenza esigua di *B. cepacia* genomovar I e *B. pyrrocinia* in entrambe le popolazioni. L'attività proteolitica è stata rilevata in tutti i ceppi ambientali e nell'80% dei clinici, l'attività emolitica nella maggior parte dei ceppi ambientali e soltanto nel 20% dei clinici, la capacità di macerare i tessuti vegetali della cipolla in tutti i ceppi esaminati. Il marker *esmR* è stato rilevato solo all'interno del *B. cepacia* genomovar III, nel 61% dei ceppi clinici e nel 15% degli ambientali, mentre il marker *cbIA* è stato evidenziato in un solo ceppo clinico. Infine, i ceppi ambientali hanno mostrato una maggiore sensibilità agli antibiotici rispetto ai ceppi clinici ($P < 0.0011$).

ISOLAMENTO DI MICRORGANISMI TERMOFILI DA CAMPIONI AMBIENTALI DI ORIGINE VEGETALE.

Francesca Venuti e Marcello Civilini

Dipartimento di Scienze degli Alimenti Università degli Studi di Udine v. Marangoni 54, 33100 Udine

Una serie di batteri G-, bastoncini, non sporigeni, aerobi, termofili, relazionabili al genere *Thermus*, sono stati isolati da campioni ambientali, a temperature variabili tra 60 e 80°C. I microrganismi isolati crescevano su un mezzo ricco e complesso a temperature tra 55 e 75°C, con crescita ottimale tra 60 e 70°C. Sono state analizzate le caratteristiche nutrizionali ed i profili di restrizione dei DNA che codificano per i 16S rRNA. I profili di restrizione dei 16S, amplificati mediante PCR, sono stati comparati con quelli di ceppi di riferimento, calcolati dalle sequenze pubblicate. Questo studio ha mostrato che i ceppi termofili isolati, sono molto vicini al genere *Thermus* e, più specificatamente, a *Thermus thermophilus* HB8 e *Thermus filiformis*.

TRIPANOSOMIASI AFRICANA CON QUADRO NOSOGRAFICO A PREVALENTE DISFUNZIONE MULTIORGANICA: DESCRIZIONE DI UN CASO

Bonazzi L.¹, Massari M.¹, Gabbi E.¹, Vecchia L.², Capatti C.², Ricci L.², Fabio A.², Farnetti E.³.

Arcispedale S. Maria Nuova RE: ¹Divisione di Malattie Infettive; ²Servizio di Microbiologia; Laboratorio di Biologia Molecolare³.

La Tripanosomiasi Africana (T.A.) è causata da emoflagellati della specie *Trypanosoma brucei* (T.b.) e trasmessa da mosche del genere *Glossina*. T.b.subsp. *rhodesiense* è isolato nell'Africa Orientale da casi acuti di notevole gravità, infetta prevalentemente animali selvatici e occasionalmente l'uomo. T.b.subsp. *gambiense* infetta soprattutto l'uomo con casi a decorso cronico. Entrambe le due forme cliniche sono letali in assenza di trattamento. La diagnosi microbiologica prevede la ricerca di T.b. nel sangue, nella linfa e LCR. Con varie metodiche immunologiche viene praticata la ricerca di anticorpi e di antigeni circolanti. La incidenza di T.A. nelle aree endemiche è del 1-2% per raggiungere in fase epidemica il 70% della popolazione. Per i turisti la malattia rappresenta un evento assolutamente raro (in USA meno di 25 casi da importazione negli ultimi 25 anni).

In questa nota viene riportato il caso di un turista di razza bianca di anni 30, rientrato in Italia dopo un soggiorno in Kenia e Tanzania. Quattro giorni prima del rientro aveva notato al malleolo tibiale interno Sn una tumefazione edematosa con tendenza ulcerativa, accompagnata da febbre elevata regredita spontaneamente dopo 1-2 giorni (striscio ematico negativo per malaria). Dopo il rientro notava la comparsa di ipercromia urinaria e di un esantema petecchiale. Al momento del ricovero risultava apiretico, ma con segni conclamati di disfunzioni multi-organiche e di coagulazione intravascolare (convalidati da alterazione dei parametri emato-chimici). Uno striscio ematico a fresco e previa concentrazione e colorazione dimostrava un notevole numero di emoflagellati rapportabili al genere *Trypanosoma*. Una indagine sierologica eseguita dopo 6 giorni dalla presunta puntura infettante risultava negativa. Il quadro clinico si è ulteriormente complicato con la insorgenza di una insufficienza renale acuta che ha richiesto la dialisi extracorporea, frequenti ipoglicemie, grave piastrinopenia, deficit dei fattori della coagulazione ed attivazione della fibrinolisi. Il paziente è sempre rimasto vigile e ben orientato, senza deficit neurologici focali. E' stato trattato con pentamidina. La risposta al farmaco è stata rapidissima con parassitemia non più rilevabile dopo due sole dosi.

Il quadro nosografico della Tripanosomiasi Africana e segnatamente della forma da T.b. *rhodesiense* è di norma caratterizzato da un esordio che segue di pochi giorni la puntura dell'insetto; nella fase acuta emo-linfatica il parassita si moltiplica attivamente nel circolo e solo in seguito invade il SNC. E' frequente il riscontro di febbre, piastrinopenia e di un esantema di tipo petecchiale. Sono riportate forme associate a CID ma, a nostra conoscenza, non è mai stata segnalata una conclamata disfunzione multiorganica nel corso della malattia.

PROSPETTIVE NELLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA DELLE EHRlichIOSI

D. Fumarola, L. Fumarola, O. Brandonisio

Sezione di Microbiologia ed Immunologia, Dipartimento di Clinica Medica, Immunologia e Malattie Infettive, Università di Bari

Le procedure di diagnostica microbiologica nei riguardi di alcune zoonosi emergenti anche nella patologia umana (Ehrlichiosi granulocitica, HGE e monocitica, HME) pongono numerose problematiche. Nella diagnostica diretta, a parte la rilevazione ematologica (peraltro infrequente) delle "morule" nel citoplasma dei granulociti o dei monociti, l'isolamento colturale (che dovrebbe rappresentare il gold standard degli accertamenti) si dimostra fastidioso per non dire deludente (Inokuma et al: J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 3031) e le prove molecolari, a detta degli esperti, non appaiono al momento, standardizzate e quindi risolutive (Weinberg, Pediatr. Infect. Dis. J. 2001,20: 435). Pertanto la diagnostica sierologica (immunofluorescenza, immunoenzimatica, Western blotting) viene considerata ancora oggi più praticabile: in particolare l'immunofluorescenza (IFA) viene indicata come "the best choice" nel gruppo delle procedure indirette, attraverso l'utilizzo sia di antigeni cellulari che, più di recente (per HGE) di antigeni cell-free (Brouqui et al. 2001; 8:199, Clin. Diagn. Lab. Immun.) su queste premesse abbiamo in corso una serie di indagini sierologiche in collaborazione anche col Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università di Napoli (Sezione di Clinica Medica: prof. E. Gravino) e dell'Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana (dr. E. Villini); l'intento è quello di verificare nella patologia veterinaria e in quella umana (HGE più frequente rispetto a HME) la positività (o negatività) dei sieri testati in IFA con antigeni cell-free, confrontate anche con i dati delle prove molecolari ed immunoenzimatiche (ELISA con antigeni da proteine ricombinanti) ivi incluse eventuali reazioni crociate descritte con sieri di altre Ehrlichiosi e/o Rickettsiosi.

BORRELIA BURGdorFERI INDUCE APOPTOSI SU LINFOCITI IN VITRO.

Prodan, Mario, Gianni Presani, Sandra Perticarari, Rossella Murgia* e Marina Cinco *

IRCSS Burlo Garofolo, Trieste, Dipartimento di Scienze Biomediche, Sez. Microbiologia, Laboratorio Spirochete, Università di Trieste.

La diagnosi di morbo di Lyme è fondata sull'osservazione delle manifestazioni cliniche associata all'indagine microbiologica. Quest'ultima, nella maggior parte dei casi consiste nella ricerca degli anticorpi, che, tuttavia, soprattutto nella fase iniziale dell'infezione, può mancare. Studi recenti effettuati in vitro hanno messo in evidenza la capacità di *B. burgdorferi* di indurre effetti citopatici su B e T linfociti, come pure apoptosi nei macrofagi. Poiché questa disfunzione a carico dei linfociti può essere in qualche modo correlata alla risposta umorale, abbiamo voluto vedere se gli effetti citopatici descritti corrispondevano all'induzione apoptotica da parte di componenti di *B. burgdorferi*. Il ceppo di *Borrelia garinii* BITS, isolato da *Ixodes ricinus*, vivo, sottoposto a sonicazione o scaldato, è stato coincubato con Linfociti purificati, in rapporto 1:20, 1:50, 1:100, alla temperatura di 37°C in atmosfera umidificata. L'apoptosi veniva valutata dopo 4 e 24 ore mediante misurazione del binding all'annessina V e colorazione con propidio ioduro, nonché espressione del CD95. La lettura degli esperimenti veniva effettuata mediante citofluorimetria a flusso multiparametrica sui cloni sottolinfocitari CD3, CD4 e CD8. Il legame all'annessina V aumentava a 24 ore nei linfociti T in presenza di Borrelie vitali o inattivate, ma non se queste venivano lisate. Venivano perimenti testate le Lipoproteine di Borrelia OspA ed OspC, nella forma lipidata e non. Soltanto l'OspC lipidata risultava attiva nell'indurre segnali apoptotici soprattutto nei CD4. Questi risultati, in vitro, indicherebbero che effettivamente componenti di *Borrelia* maggiormente espressi durante l'infezione (OspC) inducono un effetto apoptotico-FAS-mediato su popolazioni di T linfociti, prevalentemente CD4.

IL GENE *rpoS* NON E' COINVOLTO NELLO SVILUPPO DI FORME CISTICHE DI *BORRELIA BURGdorFERI*.

R. Murgia, C. Piazzetta, M. Cinco

Laboratorio spirochete, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Trieste.

La borreliosi di Lyme è una malattia che tende alla cronicità nel corso della quale il microorganismo tende a persistere. Uno degli argomenti ancora dibattuti riguarda la formazione di "forme cistiche" di *Borrelia burgdorferi* ed il loro possibile ruolo nella resistenza al trattamento antibiotico, nelle recidive della malattia e nella sopravvivenza del batterio nella zecca.

È stato recentemente dimostrato che cellule di *B. burgdorferi* si trasformano da spirochete mobili a forme cistiche non-mobili se coltivate in terreno BSK privo di siero di coniglio, e che riconvertono alla forma vegetativa se riportate in BSK contenente il 6% di siero. Recenti studi hanno dimostrato che una sospensione di cisti, può mantenere l'infettività ricreando la malattia in vivo, nel modello murino.

In questo studio si è quantizzata la cinetica di formazione delle cisti in diverse condizioni di "starvation" ed in presenza di diversi antibiotici; si è voluto inoltre vedere se il gene *rpoS*, che codifica per il fattore σ^S espresso in fase stazionaria, contribuisce alla formazione delle cisti.

A tal fine sono stati usati il ceppo BITS, ed i ceppi B31-A59 (ceppo selvatico) ed il suo ceppo isogenico derivato B31-A74 (ceppo mutante) in cui il locus per il gene *rpoS* è stato inattivato mediante scambio allelico con il gene *gyrB'*. I ceppi sono stati saggiati in condizioni di induzione alla formazione di cisti, quali quella di "starvation" in terreno BSK privo di siero o RPMI, ed in presenza di diversi antibiotici. Lo sviluppo delle cisti è stato monitorato a diversi intervalli di tempo mediante osservazione al microscopio in campo oscuro ed elettronico.

È stato così evidenziato un effetto inducente alla formazione di cisti in presenza di antibiotici β -lattamici, ma non in presenza di macrolidi.

Riguardo il ruolo del gene *rpoS*, entrambi i ceppi, selvatico e mutante sviluppavano forme cistiche senza differenze significative nel tempo di produzione ed nel numero. Questi risultati indicano che la produzione delle cisti non è sotto il controllo del fattore sigma *rpoS*, come ipotizzato.

PRESENZA DEL VIRUS TT IN BIOPSIE LINFONODALI DI PAZIENTI CON PATOLOGIE EMATOLOGICHE.

Iezzi Teresa, Garbuglia Anna Rosa, Capobianchi Maria Rosaria, Pignoloni Patrizia, Pulsoni Alessandro, Sourdis John, Pescarmona Edoardo and Mandelli Franco.

Dipartimento di Scienze Biomediche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "G. D'Annunzio" Chieti, (Teresa Iezzi); Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani", (Anna Rosa Garbuglia, Maria Rosaria Capobianchi); Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università "La Sapienza" Roma (Patrizia Pignoloni, Alessandro Pulsoni, Franco Mandelli); Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Sezione di Immunopatologia, Università "La Sapienza", Roma (Edoardo Pescarmona); Department of Biotechnology, Agricultural University of Athens, Athens (John Sourdis).

Nel 1997 è stato identificato in Giappone un nuovo virus a DNA, denominato TT (TTV), nel siero di un paziente affetto da epatite posttrasfusionale non A-G.

Inizialmente tale virus è stato considerato avere un ruolo in patologie esclusivamente epatiche, ma dati più recenti non escludono il possibile coinvolgimento del TTV in malattie del sistema ematopoietico. Tali evidenze derivano dal fatto che il virus è stato trovato nelle cellule del sangue periferico (PBMC), e del midollo osseo (BMC).

Dato il notevole aumento dell'incidenza dei linfomi registrata nel mondo negli ultimi decenni, gli autori hanno studiato la possibile correlazione tra questo nuovo virus ed alcuni linfomi molto diffusi nel mondo occidentale, quali il linfoma follicolare (FL), il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) e la malattia di Hodgkin sclerosi nodulare (NS-HD).

A questo scopo sono state utilizzate le biopsie linfonodali incluse in paraffina e/o congelate di 56 pazienti italiani.

Come controlli sono state utilizzate delle iperplasie linfoidi reattive non specifiche (RLH).

Il DNA è stato estratto da 73 campioni inclusi in paraffina e da 38 campioni congelati. Solo 67 campioni (29 inclusi in paraffina e 38 congelati) relativi a 56 pazienti, sono risultati competenti e quindi analizzati mediante PCR per valutare l'eventuale presenza della presenza del virus.

Dal nostro studio sono risultati positivi al TTV il 30% degli FL, il 30,8% dei DLBCL ed il 30% dei NS-HD. Tutti i controlli sono risultati negativi. Un'altra evidenza che è risultata da questo studio è la presenza della coinfezione da virus EBV nel 90% dei casi positivi al TTV.

La maggiore incidenza di positività al TTV (30%) riscontrata nella casistica sopradescritta, rispetto a quella riportata in letteratura, relativamente a soggetti ad alto rischio come i tossicodipendenti (14.5%), testata con l'utilizzo dello stesso set di primers, suggerisce un'attenta valutazione circa la possibile implicazione del TTV nella patogenesi di queste malattie linfoproliferative.

STUDIO SULLA SENSIBILITÀ DEI PATOGENI RESPIRATORI AL TIAMFENICOLO

Cianflone M., Cocuzza C.E., Santini L., Mattina R.

Istituto di Microbiologia Medica – Università di Milano

Negli ultimi anni si assiste sempre più frequentemente all'isolamento di batteri Gram-positivi multi-resistenti agli antibiotici. Ciò rende necessaria la ricerca di antibiotici dotati di maggior potenza antibatterica nei confronti di questi microrganismi.

Il tiamfenicolo (TAF) è un antibiotico appartenente al gruppo degli amfenicoli, derivato per semisintesi dal cloramfenicolo (CAF) per introduzione di un gruppo metilsulfonico al posto del nitrogruppo.

Questa modificazione nella struttura chimica ha praticamente eliminato gli effetti tossici legati alla formazione del nitroso e dell'idrossilammino derivati, che sono metaboliti potenzialmente responsabili dei gravi effetti ematologici attribuiti al CAF. Ciò pertanto rende quest'antibiotico molto più maneggevole rispetto al CAF. Inoltre, anche le caratteristiche farmacocinetiche del TAF sono migliori rispetto a quelle del CAF grazie alla migliore solubilità in acqua ed al minor legame sieroproteico con conseguente miglior biodisponibilità.

Scopo della nostra ricerca è stato valutare l'attività antibatterica "in vitro" del TAF in paragone ad altri antibiotici nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi isolati di recente da pazienti affetti da infezione delle alte e basse vie respiratorie. Le specie batteriche prese in esame sono state le seguenti: *S. pneumoniae* (Pen-S, Pen-R, Eri-S ed Eri-R), *S. pyogenes* (Eri-S ed Eri-R appartenenti ai 3 diversi fenotipi di resistenza), *H. influenzae* e *M. catarrhalis* produttori e non di b-lattamasi. Le M.I.C. sono state determinate con il micrometodo in terreno liquido in accordo con quanto previsto da NCCLS (1997).

Il TAF è apparso attivo sui ceppi di *S. pneumoniae* sia Pen-S che Pen-R ed Eri-R mentre l'azitromicina era inattiva sui ceppi Eri-R. Anche nei confronti dei ceppi di *S. pyogenes* il TAF ha dimostrato una buona attività sia sui ceppi eritromicina-sensibili che resistenti mentre l'azitromicina su quest'ultimi è apparsa inattiva. Sui ceppi di *H. influenzae* e *M. catarrhalis*, sia produttori che non di b-lattamasi, il TAF ha fatto registrare valori di M.I.C. sempre al di sotto del break-point di sensibilità.

I risultati di questo studio consentono di concludere che il TAF è un valido medicamento per il trattamento delle infezioni batteriche delle alte e basse vie respiratorie.

HERPESVIRUS 8 (HHV-8), NERVE GROWTH FACTOR (NGF) E SARCOMA DI KAPOSÌ (KS).

F. Pica, G. Barillari, A. Volpi, M. Frascchetti, E. Garaci

Dipartimenti di Medicina Sperimentale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".

Abbiamo mostrato in precedenza che elevati livelli sierici di NGF sono associati con la sieropositività per HHV-8 sia in pazienti affetti da KS, AIDS-correlato e non, che in individui normali. Inoltre NGF è mitogenico per cellule ottenute da lesioni di KS (cellule KS), le quali esprimono entrambi i recettori per NGF pur senza produrre il fattore (Pica F. et al., AIDS 1998, 12 (15):2025-2029). Successivamente abbiamo mostrato che NGF è essenziale sia per la sopravvivenza cellulare che per la maturazione virale in cellule infettate da HHV-8 (Pica F. et al., BLOOD 2000, 95(9):2905-2917). Tali evidenze aprono la via ad ulteriori studi volti ad una migliore comprensione dei meccanismi coinvolti nell'infezione da HHV-8 *in vivo*, nei fenomeni della persistenza virale negli individui infetti e nello sviluppo delle patologie HHV-8 correlate.

Il KS è una patologia angioproliferativa promossa da citochine angiogeniche ed infiammatorie e dall'infezione da HHV-8 (Chang J. et al., Virology 2000, 266(1):17-25). Oltre che nelle cellule B, HHV-8 è presente nei monociti circolanti, nei linfomonociti infiltranti le lesioni di KS e nei progenitori circolanti putativi delle cellule KS (peripheral blood spindle-like cells, PBSc). Questi ultimi sono stati isolati da sangue periferico di individui affetti da AIDS-KS ma anche da donatori normali (Browning P.J. et al., BLOOD 1994, 84(8): 2711-2720; Asahara T. et al., Science 1997, 275:964-967).

Il nostro obiettivo era studiare l'azione di NGF su PBSc da donatori sani per verificare se NGF fosse in grado di accelerare la differenziazione di questi precursori angioblastici in cellule con fenotipo endoteliale attivato caratteristico delle cellule KS mature. Nostri dati preliminari indicano che la coltivazione di PBMC fatti aderire su fibronectina promuove la comparsa di cellule aderenti con morfologia simile a quella delle cellule KS. Il numero di queste cellule è aumentato dall'NGF in maniera dose-dipendente (1-1000 ng/ml, picco a 10-100 ng/ml). Tale fenomeno è osservato dopo 3-4 giorni di coltura, diviene pienamente evidente a 7 giorni e dura fino ad 1 mese dall'inizio della coltura. Studi di fenotipizzazione e funzionali di tali cellule sono tutt'ora in corso.

Finanziato da ISS-Ministero della Sanità, III Programma Nazionale sull'AIDS, Roma, Italia, contributo 50C.25 (F.P.).

IL MATERIALE CAPSULARE DEL *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* LIMITA L'ESPRESSIONE E L'ATTIVITÀ BIOLOGICA DEL CD-88 (C5aR) SUI NEUTROFILI UMANI

C. Monari, C. Retini, F. Bistoni, A. Vecchiarelli.

*Dipartimento Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione Microbiologia
Università degli Studi di Perugia.*

Il *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) è un fungo capsulato, patogeno per l'uomo. La capsula è considerata il principale fattore di virulenza, il cui componente principale, il glucuronoxilomannano (GXM), è stato abbondantemente ritrovato nei fluidi biologici e nei tessuti di soggetti con criptococcosi. Il materiale capsulare conferisce al fungo proprietà antifagocitiche e immunosoppressive; inoltre media due opposte attività biologiche: l'attivazione del sistema del Complemento (C) e l'inibizione della migrazione dei neutrofili verso il sito del processo infiammatorio. L'attivazione del sistema del C genera frammenti proteolitici biologicamente attivi, come il C5a. Il C5a, il mediatore proinfiammatorio più potente, esercita numerosi effetti diretti sui neutrofili, quali l'attivazione della chemotassi e la produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno.

Al fine di comprendere il ruolo inibitorio del materiale capsulare, abbiamo avanzato l'ipotesi che la presenza della capsula potesse influenzare l'espressione del CD88 (C5aR) su neutrofili umani.

Le cellule polimorfonucleate (PMN) sono state isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità da sangue venoso periferico di soggetti sani e sono state stimolate con un mutante acapsulato (7698) da solo e/o pretrattato con GXM e con un ceppo capsulato (6995) di *C. neoformans*.

I risultati da noi ottenuti evidenziano che: 1) il trattamento con il mutante acapsulato determina un incremento dell'espressione superficiale del CD88 che correla con un aumento sia del legame del C5a che della risposta chemiotattica verso C5a; 2) l'incubazione con il mutante acapsulato pretrattato con GXM o con il ceppo capsulato induce una riduzione dell'espressione superficiale del CD88 che correla con una diminuzione del legame del C5a e della risposta chemiotattica verso C5a; 3) la produzione di O_2^- in risposta al C5a aumenta in seguito al trattamento con il mutante acapsulato, ma resta invariata in presenza del materiale capsulare. In conclusione la downregolazione dell'espressione del CD88, dovuta al materiale capsulare, corrisponde ad una diminuzione degli effetti biologici indotti dal C5a. Questo potrebbe spiegare, almeno in parte, la limitata infiltrazione dei PMN osservata durante la criptococcosi.

ANTICORPI DIRETTI CONTRO LA2 CAPSULA DEL *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* PROMUOVONO L'ESPRESSIONE DELLA SUBUNITÀ 22 DEL RECETTORE PER L'IL-12 (IL-12R22) SULLE CELLULE T IN RISPOSTA AL LIEVITO.

Donatella Pietrella, Patrizia Lupo, Francesco Bistoni, Anna Vecchiarelli.

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Microbiologia, Università di Perugia, Perugia, Italia.

Il *Cryptococcus neoformans* è un lievito capsulato che causa infezioni opportuniste in pazienti immunodepressi. Il principale fattore di virulenza è la capsula polisaccaridica che ha proprietà antifagocitiche e immunosoppressive. L'infezione avviene per via inalatoria e viene controllata a livello polmonare dalle difese immunitarie locali.

La presenza di una risposta Th1 è cruciale per la protezione contro le infezioni da *Cryptococcus neoformans*, e la produzione di IL-12 svolge un ruolo chiave in tale processo. Inoltre l'intensità di tale risposta può essere calcolata mediante l'analisi quantitativa dell'espressione della subunità IL-12R22 sulle cellule T. Lo scopo di questo studio è quello di valutare se la capsula polisaccaridica del *Cryptococcus neoformans* sia in grado di inibire la risposta Th1. A tal fine è stata valutata l'espressione del recettore IL-12R22 sulle cellule T in risposta al *C. neoformans*.

Nel nostro sistema sperimentale sono stati utilizzati monociti umani come cellule presentanti l'antigene, dopo stimolazione con i due ceppi isogenici, capsulato e acapsulato di *C. neoformans*, sono stati co-coltivati in presenza di linfociti T autologhi e su tali linfociti è stata valutata l'espressione di IL-12R22. In esperimenti selezionati il ceppo capsulato è stato opsonizzato con anticorpi specifici anti-capsula.

I nostri risultati mostrano che le cellule T rispondono al ceppo capsulato di *C. neoformans* con una ridotta espressione dell'IL-12R22 rispetto a quella ottenuta con il ceppo acapsulato. Questo correla con la ridotta produzione di IL-12 prodotta dall'APC e con la ridotta espressione delle molecole costimolatorie, quali B7, coinvolte nel processo di presentazione dell'antigene. Tale effetto inibitorio esercitato dalla capsula è stato in parte ristabilito mediante opsonizzazione con anticorpi monoclonali anti-capsula.

In conclusione questi risultati suggeriscono che anticorpi anti-capsula sono in grado di promuovere la polarizzazione dell'immunità cellulare verso una risposta Th1 protettiva nei confronti del *C. neoformans*.

INFEZIONE SPERIMENTALE E RIATTIVAZIONE DI CAPRINE HERPESVIRUS 1 NELLA CAPRA

Tempesta Maria, Greco Grazia, Pratelli Annamaria, Corrente Marialaura, Camero Michele, Guercio Annalisa*, Buonavoglia Canio

Dipartimento di Sanità e Benessere Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Strada per Casamassima km.3, Valenzano (Bari)

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Palermo*

Sei capre adulte femmine sono state infettate, tre per via nasale e tre per via vaginale, con lo stivite italiano BA.1 di caprine herpesvirus 1 (CpHV.1). Le capre infettate per via nasale hanno eliminato il virus sia per via nasale che vaginale, mentre le capre infettate per via vaginale hanno eliminato il virus solo per via vaginale. Tutti gli animali infettati hanno presentato a livello vaginale edema ed eritema vulvare e le tipiche lesioni di tipo vescicoloso-ulcerativo. Dopo sei mesi dall'infezione tutte le capre sono state sottoposte a trattamento con desametasone solfato per sei giorni per favorire la riattivazione del virus.

Analogamente a quanto osservato nell'infezione primaria, le capre precedentemente infettate per via nasale hanno eliminato il virus per via nasale e vaginale, mentre le capre infettate per via vaginale hanno escreto il virus solo per via vaginale ed hanno presentato le tipiche lesioni vulvo-vaginali. Il virus è stato eliminato per via vaginale per un periodo più lungo e a titolo più elevato rispetto alla via nasale. I risultati hanno confermato il particolare tropismo di CpHV.1 per l'apparato genitale della capra.

RICERCA DI VIRUS JC NEL LIQUOR: ANALISI DELLE SEQUENZE E DEI RIARRANGIAMENTI DELLA REGIONE DI CONTROLLO DELLA TRASCRIZIONE.

V. Pietropaolo*, M. Videtta*, D. Fioriti*, N. Orsi* e A.M. Degener**.

*Dipartimento Scienze di Sanità Pubblica, **Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università "La Sapienza", Roma.

Il poliomavirus JC è ormai universalmente riconosciuto come l'agente eziologico della PML, una malattia demielinizzante del SNC, normalmente associata a immunodepressione. Un tempo considerata malattia rara, la PML è stata recentemente riscontrata con maggior frequenza tra gli individui malati di AIDS nei quali è spesso causa di morte.

La sede primaria di latenza individuata per il virus JC è il rene. In seguito ad alterazioni immunologiche dell'ospite, il virus può andare incontro a fenomeni di adattamento nei quali la regione di controllo della trascrizione (NCCR) subisce riarrangiamenti diversi mediante delezioni e duplicazioni, che gli permetterebbero di raggiungere il SNC, di infettare gli oligodendrociti e di indurre quindi PML.

La NCCR del virus JC (ceppo archetipo), che si trova tra l'origine della replicazione e il codone ATG per i geni tardivi, può essere suddivisa in sei porzioni denominate box, ognuna delle quali contiene siti di "binding" per fattori cellulari importanti per la trascrizione virale.

I risultati di nostre ricerche precedenti hanno confermato nei PBMC di diversi soggetti HIV-positivi e negativi, con e senza PML la presenza di sequenze di JCV riarrangiate a livello della NCCR.

Abbiamo quindi analizzato la struttura della regione di controllo dei ceppi di JCV isolati da liquor di soggetti HIV-positivi e negativi, con e senza PML, ed abbiamo effettuato un'analisi di omologia e di allineamento multiplo delle sequenze ottenute con quella del ceppo archetipo.

Anche in questo caso, negli isolati da soggetti HIV-positivi e negativi senza PML, la struttura delle sequenze della regione di controllo presenta delezioni o duplicazioni rispetto alla struttura del ceppo archetipo, mentre le sequenze riscontrate nei liquor di pazienti con PML mostrano specifici e caratteristici riarrangiamenti.

I nostri risultati indicano che la presenza di riarrangiamenti diversi potrebbe essere determinante per l'emergere di un'organizzazione strutturale della NCCR del virus più adatta allo sviluppo nel tessuto nervoso.

CORRELAZIONE TRA INFEZIONI POLIMICROBICHE E CARCINOMA UROTELIALE DELLA VESCICA: RICERCA DI MICRORGANISMI PATOGENI A TRASMISSIONE SESSUALE.

D. Fioriti*, V. Pietropaolo*, A.M. Degener**, A. Pierangeli**, S. Dal Forno[^], F. D'Amico[^], C. Laurenti[^] e F. Chiarini*.

*Dipartimento Scienze di Sanità Pubblica, **Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, [^]Dipartimento di Urologia, Università "La Sapienza" Roma.

Le neoplasie uroteliali della vescica rappresentano verosimilmente il risultato dell'interazione tra agenti carcinogeni e co-carcinogeni. Recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione tra l'insorgenza di neoplasie vescicali uroteliali e l'infezione da HPV (Human Papilloma Virus).

In questo studio è stata valutata la relazione esistente tra infezioni microbiche sostenute da agenti infettivi sessualmente trasmessi (con caratteristiche di latenza, persistenza, capacità trasformante) ed il carcinoma uroteliale della vescica.

È stato analizzato un gruppo di 32 pazienti (28 uomini e 4 donne) di età compresa tra i 20 ed i 62 anni (età media 55,5) affetti da neoplasia vescicale primitiva.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a resezione transuretrale della neof ormazione vescicale (TURB). In corso di TURB sono stati prelevati frammenti di tessuto neoplastico per indagini istologiche e microbiologiche. In quest'ultimo caso si è proceduto alla ricerca di HPV, herpes simplex tipo 1 e 2 (HSV 1 e 2), poliomavirus (BKV e JCV), adenovirus, Chlamydia trachomatis e Mycoplasma genitalium mediante reazione polimerasica a catena (PCR).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che il 42.8% dei soggetti esaminati (stadio di neoplasia TaG1 e TaG2) era positivo ad infezioni microbiche. Di questi il 78.5% era positivo per infezioni da BKV; il 35.7% per infezioni da BKV + JCV; il 14.2% per infezioni da BKV + JCV + Chlamydia trachomatis; il 7.1% per infezioni da adenovirus + BKV + HPV.

Tre pazienti sono risultati positivi per infezioni monomicrobiche: un paziente per herpes virus, un altro per adenovirus ed il terzo per Chlamydia trachomatis.

Nessun soggetto mostrava positività per Mycoplasma genitalium.

Lo studio, anche se preliminare, può suggerire una possibile correlazione tra infezioni microbiche (con caratteristiche di latenza, persistenza, capacità trasformante) e carcinoma uroteliale della vescica.

INTERAZIONI TRA BATTERI ED EMOCITI DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*.

Carla Pruzzo¹, Laura Canesi², Massimiliano Zampini¹, Renato Tarsi¹, Gabriella Gallo³.

Istituto di Microbiologia, Università di Ancona¹; Istituto di Fisiologia, Università di Urbino²; DIBISAA, Università di Genova³.

I mitili possono filtrare notevoli volumi di acqua di mare e sono perciò continuamente esposti ad un numero enorme di batteri. Il destino dei batteri all'interno del mitilo dipende da numerosi fattori tra cui la resistenza all'attività fagocitica degli emociti. Tali cellule svolgono funzioni simili a quelle dei monociti e dei macrofagi dei vertebrati e costituiscono una prima linea di difesa contro agenti patogeni. I microrganismi che sopravvivono all'attività microbica degli emociti sono in grado di stabilire interazioni stabili con i tessuti dei molluschi e, se si tratta di patogeni per i bivalvi, possono esprimere le loro caratteristiche di virulenza; se si tratta di patogeni per l'uomo, possono raggiungere le concentrazioni sufficienti a causare malattia quando ingeriti crudi. Poiché la conoscenza dei parametri che influenzano le interazioni tra batteri ed emociti può costituire la base per il miglioramento dei processi di depurazione di questi molluschi eduli e, di conseguenza, per la prevenzione delle malattie a trasmissione idrica, recentemente abbiamo intrapreso una ricerca sulle modalità con cui i batteri interagiscono con le cellule del sistema immunitario dei mitili (Canesi et al. 2001. Appl. Env. Microbiol. 67:464-468). In questo lavoro abbiamo studiato la fagocitosi e il killing di *E. coli* e *V. cholerae* (O1, O139 e non O1/O139) da parte di emociti di *M. galloprovincialis* allo scopo di mettere in evidenza i ligandi batterici coinvolti. È stato osservato che l'emolinfa filtrata aumenta di 2-3 volte l'adesione, l'associazione e il killing da parte degli emociti di tutti i ceppi analizzati. Dal confronto tra ceppi selvaggi e mutanti privi di adesine note è emerso che i ligandi mannosio-sensibili sono coinvolti in queste interazioni. Infatti, i risultati ottenuti hanno dimostrato che, in presenza di emolinfa filtrata, i mutanti di *E. coli* privi di fimbrie di tipo 1 e di *V. cholerae* privi dell'emoagglutinina mannosio-sensibile sono meno adesivi e meno sensibili al killing dei ceppi selvaggi e che queste interazioni sono inibite dal mannosio. Esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che la clearance dei batteri provvisti di adesine mannosio-sensibili è più rapida di quella dei batteri che ne sono privi. Questi dati suggeriscono che l'emolinfa dei mitili contiene opsonine che, interagendo con ligandi batterici specifici per il mannosio, favoriscono l'adesione dei microrganismi ai fagociti e il loro killing.

MACROFAGI INGEGNERIZZATI COME VETTORI DI GENI TERAPEUTICI

Mucci^o Anna, Varesio* Luigi, Neglia^o Rachele, Colombari^o Bruna, Pastorino* Sandra, Blasi^o Elisabetta.

**Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena*

**Laboratorio di Biologia Molecolare, Ospedale G. Gaslini, Genova*

Base: Il macrofago svolge un'importante attività antimicrobica, che aumenta in seguito a stimolazione con diverse citochine. L'IFN γ , prodotto dal linfocita T, rappresenta il principale attivatore macrofagico, pertanto, per una risposta antimicrobica ottimale, il macrofago dipende inevitabilmente da altre cellule del sistema immunitario. Recentemente (Carta L. e coll., J. Immunol. 2001), una linea macrofagica murina (Mf10) è stata ingegnerizzata con un costrutto in cui il gene dell'IFN γ risulta inducibile grazie al controllo di un promotore (HRE3x-Tk) sensibile a segnali specifici, tra cui teoricamente l'acido picolinico (PA). Nel presente studio, è stato valutato lo stato funzionale di tali macrofagi, esposti e non a PA, e il possibile ruolo biologico dell'IFN γ da essi prodotto.

Metodi: È stata saggiata l'attività antifungina nei riguardi di *Cryptococcus neoformans* o *Candida albicans*, la produzione di IFN γ e di ossido nitrico, mediante saggi biologici e colorimetrici. L'attività biologica dell'IFN γ prodotto dai Mf10 è stata valutata in un sistema transwell, misurandone gli eventuali effetti sulla attività funzionale di un'altra popolazione macrofagica (cellule di microglia BV2 infettate con *C. neoformans* o *C. albicans*).

Risultati: I Mf10 possiedono un'attività anticriptococcica e anticandida costitutiva ed esprimono bassi ma rilevabili livelli di RNA messaggero per IFN γ e iNOS. Dopo trattamento con PA, sia l'espressione genica che l'attività antifungina aumentano significativamente.

L'IFN γ prodotto dalle cellule Mf10 esposte a PA si è dimostrato biologicamente attivo in quanto capace di stimolare, nel sistema transwell, le cellule BV2 nelle loro funzioni effettrici. In particolare, un aumento della fagocitosi e dell'attività antifungina si osserva quando le BV2 sono co-coltivate con Mf10 pretrattati con PA, condizione in cui si ha la massima produzione di IFN γ . Tale aumento viene abrogato in seguito all'aggiunta di anticorpi anti-IFN γ .

Conclusione: I Mf10 ingegnerizzati rispondono al PA con produzione di IFN γ e con aumento dell'attività antifungina; l'IFN γ prodotto dai Mf10 risulta biologicamente attivo. Ciò suggerisce l'impiego dei Mf10 *in vivo* come vettori di geni terapeutici in protocolli sperimentali di terapia genica contro patologie da opportunisti fungini in cui l'IFN γ svolge un ruolo determinante.

ATTIVITA' ANTIFUNGINA DI CELLULE MICROGLIALI UMANE: VALUTAZIONE DEL DANNO MITOCONDRIALE IN *Candida albicans* (Ca) e *Cryptococcus neoformans* (Cn)

Neglia° Rachele, Colombari° Bruna, Cossarizza* Andrea, Mucci° Anna, Pinti* Marcello, Blasi° Elisabetta

°Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche; *Dipartimento di Scienze Biomediche; Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

Base: La microglia, macrofago residente del sistema nervoso centrale (CNS), gioca un ruolo prioritario nella sorveglianza immunologica di questo distretto, grazie alla capacità di esprimere funzioni effettrici e secretorie, anche profondamente modulabili in risposta a stimoli immunologici e/o farmacologici. Ciò nonostante, molti patogeni riescono ad eludere questo sistema di difesa, elaborando peculiari strategie di evasione; il dimorfismo di *Candida albicans* (Ca) (Blasi et al., Infect.Immun.1992) così come la plasticità biomolecolare di *Cryptococcus neoformans* (Cn) (Blasi et al., Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 2001) sono due esempi particolarmente interessanti. Il presente studio è volto ad investigare il complesso rapporto microglia-Ca e microglia-Cn attraverso un modello di infezione in vitro che utilizza una linea microgliale di origine umana.

Metodi: Infezioni in vitro di cellule di microglia umana (Linea SVA3) con Ca o Cn; verifica dello stato funzionale di SVA3 e del danno subito dal fungo, mediante saggi di fagocitosi e di inibizione della crescita, test in RT-PCR e citofluorimetria.

Risultati: Le cellule SVA3 sono attive sia contro Ca che contro Cn; l'impiego di funghi opsonizzati e/o l'esposizione di SVA3 ad acido picolinico, un catabolita del triptofano riscontrabile in vari fluidi biologici e nei tessuti infiammati, ne esalta l'efficacia. Sebbene non internalizzati, ciascuno dei funghi esposti a SVA3 dimostra un danno funzionale rilevabile come depolarizzazione della membrana mitocondriale. Il fenomeno, che non richiede contatto diretto, è mediato dalla secrezione di sostanze solubili ed è esaltato in seguito a stimolazione delle cellule SVA3 con endotossina.

Conclusioni: Le cellule SVA3 esprimono attività antifungina nei riguardi di Ca e Cn. Il mitocondrio fungino si rivela un importante bersaglio, funzionalmente danneggiabile da parte dell'immuno-effettore cerebrale.

ATTIVITÀ ANTIMICOBATTERICA DI NUOVI S-ALCHILISOTIOSEMICARBAZONI E POTENZIAMENTO DELL'ATTIVITÀ DI RIFAMPICINA E RIFABUTINA NEI CONFRONTI DI *M. AVIUM*

Alessandro De Logu^a, Valentina Onnis^b, Maria Luisa Pellerano^a, Maria Cristina Pusceddu^a, Cenzo Congiu^b, Barbara Saddi^c, Maria Antonietta Marcialis^a, Maria Teresa Cocco^b

^aSezione di Microbiologia e Virologia, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, e ^bDipartimento di Tossicologia, Università di Cagliari, ^cLaboratorio di Analisi ASL 8, Cagliari

Mycobacterium avium è causa di batteriemia ed infezioni disseminate, in particolare in pazienti affetti da AIDS nei quali rappresenta una delle infezioni opportunistiche più frequenti. Attualmente poche classi di farmaci, quali rifabutina, etambutolo e macrolidi, sono impiegabili in terapia. Inoltre l'insorgenza di ceppi resistenti ai macrolidi e l'interazione tra rifamicine e gli inibitori delle proteasi indicano la necessità di disporre di nuove classi di molecole efficaci nella terapia delle infezioni sostenute da *M. avium*.

Abbiamo sintetizzato una nuova classe di S-alchilisotiosemicarbazoni, alcuni dei quali dimostrano *in vitro* una selettiva attività sia nei confronti di *M. avium* ATCC 19421 che nei confronti di ceppi di *M. avium* isolati da campioni clinici con valori di MIC, determinati con il metodo della diluizione in agar 7H11, fino a 0.78 mg/ml, mentre sono meno attivi nei confronti di *M. tuberculosis* ed altri MOTT. I saggi di tossicità cellulare tramite riduzione di MTT condotti su monostrati di cellule Vero indicano valori di MNTD a concentrazioni sensibilmente più elevate dei valori di MIC. Alcuni dei derivati isotiosemicarbazonici saggiati sono inoltre in grado di inibire la adesione di *M. avium* a cellule HT-29 di carcinoma del colon, cellule con marcate caratteristiche di cellule intestinali umane.

Studi di sinergismo condotti su *M. avium* ATCC 19421 mediante determinazione delle FIC (Fractional Inhibitory Concentration) combinando concentrazioni sub-inibenti dei composti in esame e rifampicina, rifabutina ed amikacina, indicano un forte effetto sinergico con riduzione della MIC della rifabutina a 0.0027 mg/ml (MIC_{rifabutina} 0.23 mg/ml) e della MIC della rifampicina a 0.09 mg/ml (MIC_{rifampicina} 12.5 mg/ml).

Gli isotiosemicarbazoni rappresentano dunque una promettente classe di molecole per il trattamento delle infezioni sostenute da *M. avium*. Inoltre la diminuzione dell'efficacia *in vivo* di metadone e zidovudina indotta dalle rifamicine tramite induzione dei livelli degli enzimi microsomiali epatici potrebbe essere ridotta mediante riduzione delle dosi terapeutiche di rifamicine con l'impiego di S-alchilisotiosemicarbazoni.

CARATTERI MOLECOLARI E VIRULENZA DI *MYCOBACTERIUM AVIUM*

Laura Rindi, Nicoletta Lari, Carlo Garzelli

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa

La tipizzazione intraspecifica di *Mycobacterium avium* può contribuire a chiarire molti aspetti dell'epidemiologia e della patogenesi delle infezioni da *M. avium*, tra cui i caratteri molecolari dei ceppi patogeni per l'uomo.

In questo lavoro, sono stati tipizzati 60 ceppi di *M. avium*, di origine umana, animale o ambientale, sulla base della sequenza nucleotidica ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del rDNA 16S-23S. Trentatré ceppi sono risultati di sequevar Mav-A; 6 di questi provenivano da pazienti HIV-positivi, 5 da pazienti HIV-negativi, 20 da animali e 2 da fonti ambientali. Diciassette isolati, provenienti esclusivamente da infezioni umane, sono risultati di sequevar Mav-B; 16 di questi provenivano da pazienti HIV-positivi. Dei 10 ceppi di sequevar Mav-C, 1 era di provenienza umana, mentre 5 e 4 isolati provenivano rispettivamente da animali e dall'ambiente. Non sono stati trovati ceppi di sequevar Mav-D ed -E. Trenta isolati sono stati ulteriormente tipizzati mediante analisi RFLP basata sulla sequenza di inserzione IS1245. Profili RFLP polimorfici a bandeggio multiplo sono stati ritrovati in 10 su 11 isolati umani di sequevar Mav-A, in 13 su 13 isolati umani di sequevar Mav-B, ed in 1 su 5 isolati umani di sequevar Mav-C; 1 isolato umano di sequevar Mav-A ed il ceppo aviario ATCC 35712 mostravano invece il tipico *fingerprint* aviario costituito da 2 bande IS1245-specifiche; 4 isolati ambientali di sequevar Mav-C erano caratterizzati da un'unica banda IS1245-specifica.

Allo scopo di stabilire una eventuale relazione tra i caratteri molecolari e la virulenza dei ceppi, i 30 isolati sono stati saggiati per la capacità di infettare e crescere in macrofagi umani. A tale scopo, culture di monociti di sangue periferico (PBMC) e di cellule fagocitarie THP-1 sono state infettate alla molteplicità di 50:1 con ciascun isolato e le CFU intracellulari sono state determinate a 2 ore e a 5 giorni di infezione. È stato trovato che tutti gli isolati di sequevar Mav-C erano ingeriti più efficientemente degli isolati di sequevar Mav-A e -B dai PBMC e uccisi sia dai PBMC che dalle cellule THP-1; al contrario, 10 su 12 isolati di sequevar Mav-A erano capaci di crescita intracellulare in almeno un tipo di fagocita; inoltre, solo 4 dei 13 isolati di sequevar Mav-B si moltiplicavano nei PBMC e 12 isolati erano uccisi dalle cellule THP-1.

I risultati indicano quindi differenze sequevar-dipendenti nella virulenza degli isolati di *M. avium*.

TRASFERIBILITÀ DELLA RESISTENZA ALLA TETRACICLINA IN CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATI DA ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE IN ITALIA.

Manoocheher Pourshaban, Anna Maria Ferrini, Veruscka Mannoni, Brunello Oliva⁽¹⁾ e

Paolo Aureli

Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio Alimenti, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma

⁽¹⁾ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia, Università dell'Aquila, L'Aquila

Nell'ambito di un programma di monitoraggio sulla presenza di *Listeria monocytogenes* in alimenti, relativamente a prodotti di origine animale, sono stati isolati e saggiati 148 ceppi per le resistenze a 18 differenti antibiotici di uso umano e veterinario. Tale screening ha permesso l'individuazione di 2 ceppi (*L. monocytogenes* 286 e 266) che mostravano multiresistenza a: tetraciclina, flumechina, lincomicina e fosfomicina. Nel trasferimento di queste resistenze, si è potuto seguire soltanto il gene *tet*, poiché i ceppi riceventi (*Enterococcus faecalis* JH2-2 e *Listeria ivanovii* CIP 7842) erano di per se stessi sensibili alla tetraciclina, ma resistenti alle altre molecole. Tale resistenza è risultata trasmissibile dai 2 ceppi *L. monocytogenes* 266 e 286 e dal controllo *L. innocua* 52P a *L. ivanovii*, mentre soltanto *L. monocytogenes* 286 e il controllo *L. innocua* 52P trasferivano a *E. faecalis*. L'analisi molecolare dimostrava una localizzazione cromosomica per il determinante di resistenza alla tetraciclina che veniva identificato come *tetM*. Il nostro studio dimostra, a parer nostro, per la prima volta, che *L. monocytogenes* isolata dagli alimenti può costituire un serbatoio di geni di resistenza alla tetraciclina capaci di diffondere ad altri microrganismi sia ambientali che enterici.

LA PROTEINA DI MATRICE P17 DI HIV-1 INCREMENTA LA PRODUZIONE DI CITOCINE PROINFIAMMATORIE ED INIBISCE L'ATTIVITÀ DI IL-4 IN SEGUITO AL LEGAME CON UN RECETTORE CELLULARE

M. A. De Francesco, M. Baronio, C. Signorini, C. Poiesi e A. Caruso

Istituto di Microbiologia

Università degli Studi di Brescia

La proteina ricombinante p17 incrementa significativamente la replicazione di HIV-1 in colture preattivate di PBMCs ottenute da donatori sani. Poiché l'infezione e la replicazione di HIV-1 sono correlate all'attivazione ed allo stato di differenziazione cellulare, nel presente studio noi abbiamo analizzato il ruolo svolto dalla p17 durante la stimolazione dei linfociti T.

Utilizzando colture fresche di PBMCs, noi abbiamo dimostrato che la p17 è in grado di aumentare i livelli di produzione di TNF- α ed IFN- γ da parte di cellule stimolate con IL-2. E' noto che IL-4 svolge un ruolo anti-infiammatorio inibendo la produzione sia di IFN- γ che di TNF- α in colture stimolate con citochine diverse. L'aggiunta di p17 esogena a colture stimolate con IL-2 ripristinava la capacità delle cellule di produrre ambedue le citochine anche in presenza di IL-4. La proprietà di p17 di aumentare la produzione di citochine proinfiammatorie potrebbe essere un meccanismo utilizzato da HIV-1 per creare un ambiente più favorevole per l'infezione e la sua replicazione.

I nostri dati dimostrano che la p17 svolge la sua attività biologica dopo il legame con uno specifico recettore cellulare espresso sui linfociti T dopo attivazione. L'epitopo funzionale di p17 coinvolto nel legame al recettore è localizzato nella regione NH₂-terminale della proteina virale. L'immunizzazione di topi Balb/c con un peptide sintetico di 14 aminoacidi rappresentativi della regione funzionale di p17 di HIV-1 (SGGELDRWEKIRLR) ha portato alla produzione di anticorpi neutralizzanti la p17, capaci di bloccare l'interazione tra p17 ed il suo recettore cellulare. I nostri risultati attribuiscono un nuovo ruolo per p17 nella patogenesi di HIV-1 e possono contribuire sia ad una migliore comprensione del meccanismo molecolare dell'infezione da HIV-1 che allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche antivirali.

IDENTIFICAZIONE DI LOCI GENICI COINVOLTI NELLA SPECIFICITÀ D'OSPITE DI SALMONELLA ENTERICA SEROVAR ABORTUSOVIS.

D.Bacciu, N.Canu, A.Spazziani, S.Uzzau, S.Rubino

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sez. di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università di Sassari.

Una collezione di mutanti STM (signature tagged mutagenesis) di Abortusovis è stata utilizzata allo scopo di individuare i determinanti genici responsabile della specificità d'ospite di questo sierotipo specifico per l'ospite ovino.

Ciascun mutante della collezione presenta una differente inserzione nel cromosoma di un trasposone la cui peculiarità è quella di contenere all'interno una regione centrale variabile di 40 bp, fiancheggiata da sequenze costanti di 20 bp, che permettono l'amplificazione e la marcatura delle porzioni centrali mediante PCR. Poiché ciascun trasposone contiene una diversa sequenza che permette di differenziare un mutante da un altro ("tagged"), l'utilizzo di questo tipo di mutagenesi è risultato vantaggioso in quanto è possibile seguire il destino di un gran numero di mutanti all'interno di un singolo animale e/o paragonare il diverso destino di un mutante specifico in due o più differenti specie ospiti.

La nostra collezione dei mutanti, è stata testata in vivo sia nel modello murino che ovino. Sono stati individuati 25 mutanti capaci di provocare malattia nel topo ma non nell'agnello, e due mutanti capaci di provocare malattia nell'agnello ma non nel topo.

I mutanti con alterata specificità d'ospite sono stati caratterizzati genotipicamente e fenotipicamente.

Il DNA genomico fiancheggiante ciascun sito di inserzione del trasposone, è stato amplificato utilizzando la metodica dell'arbitrary PCR, e i prodotti di amplificazione sono stati clonati e sequenziati.

Una delle sequenze identificate mostra un'omologia significativa con un locus codificante per *yhjC*, un regolatore trascrizionale appartenente alla famiglia LysR. Altri regolatori positivi appartenenti alla stessa famiglia, incluso SpvR, regolano positivamente la trascrizione di geni di *Salmonella* coinvolti nella fase sistemica dell'infezione.

EVOLUZIONE DI QUASISPECIE VIRALI E PROFILO DI MOLECOLE DI DERIVAZIONE CELLULARE PRESENTI SULL'HIV NEL SANGUE E NEL LIQUOR

Abbate I., Cappiello* G., Longo R., Ursitti A., *Calcaterra S., Spanò A., *Capobianchi MR

*INMI "L.Spallanzani", Ospedale "S.Pertini", Roma.

Obiettivo. Le molecole di derivazione cellulare (CMP) incluse nell'envelope virale possono fornire indicazioni circa la tipologia cellulare che ha ospitato la replicazione del virus. Abbiamo determinato il profilo di CMP in campioni appaiati di liquor e plasma di soggetti HIV-1 infetti, e, in parallelo, la composizione delle quasispecie virali nei due distretti anatomici.

Metodi. L'analisi del pattern di CMP presenti sul virus è stata eseguita, dopo opportuna purificazione del virus presente nei materiali biologici, attraverso immunocattura con anticorpi, seguita dalla quantificazione del virus catturato mediante RT-PCR. I marcatori considerati sono: CD26, CD45RO, CD36, CD58, N-CAM, VCAM-1, ELAM-1, CD44, ed il recettore per il glutammato (Glut-R). L'analisi di quasispecie è stata eseguita, con programmi bioinformatici, dopo clonaggio e sequenziamento della regione ipervariabile V3 della gp120.

Risultati. La caratterizzazione è stata eseguita su 5 coppie plasma/liquor provenienti da altrettanti pazienti. Dall'analisi comparativa dei due distretti emerge che il virus presente nel liquor è in genere più povero di CMP rispetto al virus omologo presente nel sangue. La molecola più rappresentata in entrambe le popolazioni virali è il CD44, mentre le altre molecole di adesione sono scarsamente rappresentate. Il marcatore monocitario CD36 è più rappresentato nel virus del distretto ematico che nel distretto liquorale. Paragonando le popolazioni virali presenti nei singoli pazienti emerge che a pattern di CMP è molto diversi tra i due distretti, corrisponde una composizione di quasispecie virali divergente, compatibile con una storia replicativa separata; quando invece il quadro di CMP è simile nei due distretti, le due popolazioni virali non mostrano evoluzione indipendente.

Questi dati indicano che l'analisi di quasispecie virali e del pattern di CMP può essere combinata per ottenere indicazioni sulla sorgente cellulare dei virioni presenti in vari distretti anatomici, e sulla loro storia evolutiva all'interno dell'organismo. Ciò appare di particolare interesse nello studio dei reservoir virali e del loro ruolo nel rebound dopo interruzione della terapia o in seguito a sviluppo di resistenza.

DIVERSITÀ GENETICA DI *HELICOBACTER PYLORI* IN PAZIENTI RESISTENTI ALLA TERAPIA

L. Cellini¹, E. Di Campi¹, M. Di Candia¹, A. Gingillo¹, G. Donelli², L. Marzio³.

Dipartimenti di ¹Scienze Biomediche e ³Medicina e Scienze dell'Invecchiamento - Facoltà di Medicina - Università "G. D'Annunzio" - Chieti - ²Laboratorio di Ultrastrutture - Istituto Superiore di Sanità - Roma.

Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare le dinamiche genotipiche di una popolazione di *Helicobacter pylori* isolato dall'antro e dal corpo gastrico di pazienti con ulcera duodenale (U.D.) trattati con triplice terapia. Nei ceppi *H.pylori* resistenti si è valutata, inoltre, la presenza del gene *CagA*.

Metodi. Campioni biotici, dall'antro e dal corpo, sono stati prelevati in 104 pazienti *H.pylori* positivi. I pazienti sono stati trattati con terapia combinata di Claritromicina, Tinidazolo e Omeprazolo per una settimana e l'eradicazione è stata valutata dopo 4 e 16 settimane.

I DNA dei ceppi isolati sono stati amplificati mediante RAPD-PCR con sequenze arbitrarie di oligonucleotidi (1281, 1247) per i fingerprinting, mentre la presenza del gene *CagA* è stata accertata mediante l'amplificazione di un frammento di 298 pb.

Risultati. *H.pylori* è stato eradicato nel 95.2% dei pazienti trattati.

L'analisi dei profili genomici da singole colonie di *H.pylori* dall'antro e dal corpo di pazienti sensibili alla terapia, ha mostrato con i primer utilizzati fingerprinting identici, con una maggiore risoluzione dell'oligonucleotide 1281 rispetto al 1247. Al contrario, nei pazienti resistenti alla terapia, lo studio dei ceppi isolati da biopsie prelevate all'inizio del trattamento e dopo 4 e 16 settimane, ha evidenziato un'ampia eterogeneità genomica tra i microrganismi isolati sia dall'antro che dal corpo.

Infine, tutti i ceppi *H.pylori* resistenti hanno conservato lo status *CagA* nei tempi di valutazione dello studio.

Conclusioni. I risultati ottenuti dimostrano che pazienti eradicati con triplice terapia (Clarithromicina, Tinidazolo, Omeprazolo) sono caratterizzati dalla colonizzazione di ceppi di *H.pylori* con profili genomici identici; mentre variazioni genetiche significative sono osservate in ceppi resistenti *CagA* positivi. Da quanto esposto, si può concludere che le condizioni di pressione selettiva, dovute ai trattamenti farmacologici, favoriscono la presenza di variabilità nei ceppi di *H.pylori*. Quest'ultima condizione può rappresentare un aspetto importante nell'adattamento batterico all'ospite.

HHV-6 IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA: ALTA FREQUENZA DEL DNA VIRALE NELLE PLACCHE ISOLATE MEDIANTE LASER MICRODISSECTION AND CATAPULTING

Cermelli Claudio¹, Beretti Francesca¹, Jacobson Steven², Portolani Marinella¹

¹Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

²Viral Immunology Section, Neuroimmunology Branch, NINDS, NIH, Bethesda, MD, USA

Numerosi e sempre crescenti dati di tipo epidemiologico, immunologico e molecolare suggeriscono un'associazione tra l'herpesvirus umano 6 (HHV-6) e la sclerosi multipla (SM), anche se il ruolo di questo virus nella SM è ancora ampiamente oggetto di dibattito. La letteratura scientifica riporta numerosi studi sul ritrovamento del DNA di HHV-6 in materiali biologici da pazienti con MS con una più alta frequenza rispetto a vari tipi di controllo. Le metodiche utilizzate in questi studi, tuttavia, non consentivano di determinare la localizzazione del DNA virale nel tessuto patologico o in quello normale. Scopo del nostro studio è stato stabilire la frequenza del DNA di HHV-6 in materiale autoptico cerebrale da placche di SM in confronto a quella in materia bianca apparentemente normale (MBAN) degli stessi pazienti e di pazienti con altre patologie neurologiche e di soggetti neurologicamente normali. Per selezionare aree di tessuto cerebrale altamente specifiche da tessuti cerebrali fissati in formalina e paraffinati è stato utilizzato un laser microscopio (Robot-MicroBeam laser microscope- P.A.L.M.- Germania). Mediante questo strumento aree estremamente piccole e altamente specifiche di placche o MBAN sono state selezionate, tagliate e catapultate nel coperchio di una microprovetta da PCR senza alcun contatto manuale. Il DNA veniva quindi estratto e sequenze di HHV-6 ricercate mediante nested PCR. Trentasette su 64 (57.1%) campioni da placche di SM e 7/44 (15.9%) da MBAN dagli stessi pazienti sono risultati positivi per HHV-6 ($p < 0.001$). Nei pazienti con altri disordini neurologici 10/46 campioni (21.7%) erano positivi, mentre nei controlli senza patologie neurologiche 11/41 (26.8%). La frequenza di HHV-6 nelle placche di SM è risultata statisticamente più elevata rispetto a quella di ogni altro tipo di controlli, mentre nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra i vari gruppi di controllo. Inoltre, la frequenza di HHV-6 è risultata più alta nelle placche attive rispetto a quelle croniche. Nel complesso, questi risultati supportano l'ipotesi di un ruolo nella patogenesi di HHV-6 nella SM.

EVOLUZIONE DI QUASISPECIE DI HCV DURANTE TRATTAMENTO COMBINATO

Di Stefano R, Cappiello G*, Abbate I[^], Lo Iacono O*, Longo R[^], Solmone MC*, Ferraro D, Antonucci G*, Di Marco V, Craxì A, Ippolito G, Capobianchi MR*.

Università di Palermo, *INMI "L.Spallanzani", [^]Ospedale "S.Pertini", Roma.

Obiettivo Per identificare parametri predittivi di risposta alla terapia nell'infezione da HCV, sono stati considerati i seguenti fattori: cinetica di abbattimento della viremia; presenza di mutazioni nella regione ISDR; eterogeneità ed evoluzione di quasispecie virali nella regione HVR-1.

Disegno sperimentale 45 pazienti con epatite cronica da HCV (genotipo 1b, viremia 938.080 ± 125.007 IU/ml, grado medio METAVIR 2, stadio 2), di cui 23 trattati con PEG-IFN a2b + ribavirina e 22 con IFN a2b standard + ribavirina, sono stati selezionati da uno studio clinico randomizzato, e suddivisi in base alla risposta virologica a 6 mesi di trattamento. 28 erano R (15 PEG-IFN, 13 STD-IFN) e 17 NR (8 PEG-IFN, 7 STD-IFN). La sequenza della regione ISDR è stata determinata da prodotti di PCR, in tutti i pazienti prima della terapia (T0), e nei pazienti con viremia misurabile ($n=30$) dopo un mese di terapia (T1). L'eterogeneità genetica è stata valutata al T0 ed al T1 in 20 pazienti (10 IFN-PEG e 10 IFN standard), mediante clonaggio della regione HVR-1 e sequenziamento di almeno 10 cloni/paziente. L'eterogeneità è stata determinata calcolando complessità, diversità, rapporto mutazioni non sinonime/mutazioni sinonime per sito (NS/S). Dalle sequenze dei cloni HVR-1 di ogni paziente sono stati costruiti gli alberi filogenetici.

Risultati In base alle mutazioni della regione ISDR rispetto alla sequenza di riferimento dell'HCV 1b, i pazienti sono stati classificati in WT (no mutazioni), IT (1-3 mutazioni) ed in MT (più di 3 mutazioni). Al T0 non si è riscontrata differenza nella distribuzione dei tre pattern tra R (25% WT, 64% IT, 11% MT) ed NR (29% WT, 65% IT, 6% MT). Al T1 solo in 8/30 soggetti si sono osservati lievi cambiamenti della sequenza ISDR, senza differenze significative tra R e NR.

Le differenze dell'eterogeneità genetica in HVR-1 al T0 erano statisticamente significative tra R ed NR per quanto riguarda la complessità ed il rapporto NS/S ($p=0.038$ e $p=0.027$). Inoltre negli R si è rilevato al T1 una significativa diminuzione della complessità, una tendenza alla diminuzione della diversità, ed un aumento del rapporto NS/S. Gli alberi filogenetici della regione HVR-1 mostrano un profondo cambiamento delle quasispecie virali nei soggetti R, con un clustering dei cloni al T1 distinto rispetto al T0. Invece negli NR l'evoluzione della regione HVR-1 sembra rispecchiare la deriva genetica casuale.

MORTE CELLULARE PROGRAMMATA IN *HELICOBACTER PYLORI*

G. Donelli¹, I. Robuffo², E. Di Campi³, M. Di Candia³, L. Cellini³.

¹Laboratorio di Ultrastrutture - Istituto Superiore di Sanità - Roma.

²Istituto di Citomorfologia Normale e Patologica del CNR - Università "G. D'Annunzio" - Chieti.

³Dipartimento di Scienze Biomediche - Facoltà di Medicina - Università "G. D'Annunzio" - Chieti.

Helicobacter pylori, in condizioni subottimali di crescita, reagisce con modificazioni morfologiche e metaboliche finalizzate all'acquisizione di una maggiore resistenza allo stress.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare le forme intermedie che si rilevano nella transizione dalla morfologia spirale a quella coccoide, in particolare, studiando quella parte della popolazione coccoide che mostra, sia a livello ultrastrutturale che biomolecolare, aspetti che richiamano la morte cellulare programmata osservata negli eucarioti.

Metodi e Risultati. Brodocolture di *H. pylori* ATCC 43629 e del ceppo clinico C₁P₁T₀, incubate fino a 14 giorni in microaerofilia, a 37°C e a temperatura non permissiva di 4°C, sono state utilizzate per le indagini ultrastrutturali e molecolari.

Evidenza di morte cellulare programmata in *H. pylori* è stata fornita dall'osservazione di corpi elettrondensi (EDB) in microscopia a trasmissione contenenti DNA condensato come dimostrato sperimentalmente tramite marcatura citochimica (DNasi I-gold). Tali aspetti morfologici hanno trovato conferma nei dati ottenuti mediante elettroforesi su gel di agarosio dove si è evidenziato il taglio del DNA batterico in frammenti omogenei di circa 100 paia di basi. La morte cellulare programmata è stata osservata in colture a 37°C; nel 37.5% delle cellule si potevano osservare corpi elettrondensi dopo 7 giorni d'incubazione. La temperatura non permissiva di 4°C anticipava questo processo con la comparsa di EDB nel 40% dei batteri entro 3 giorni, conservando questa condizione durante tutto il tempo di osservazione.

Conclusioni. In questi esperimenti, la temperatura non permissiva e la riduzione dei nutrienti conseguente alla prolungata incubazione, agiscono come "trigger" significativi per l'avvio del processo apoptotico. Si è quindi ipotizzato che *H. pylori*, in condizioni sfavorevoli, possa rispondere a stimoli di stress attivando tali processi di morte cellulare programmata ai fini di modulare la densità microbica per la conservazione della specie.

FATTORI CELLULARI COINVOLTI NELLA RESISTENZA AGLI ANALOGHI NUCLEOSIDICI ANTI-HIV.

O. Turriziani¹, F. Bambacioni², J. Schuetz³, C. Scagnolari¹, F. Bellomi¹, N. Gianotti⁴, A. Lazzarin⁴, F. Dianzani, G. Antonelli¹.

¹Dip.to Med. Sper. e Patologia-Sez. Virologia, Università "La Sapienza", Roma. ²Libera Università Campus Bio-medico, Roma; ³St. Jude Children Hospital, Memphis; ⁴Clinica di Malattie Infettive, IRCCS S. Raffaele, Milano.

L'ipotesi di lavoro consiste nel verificare la possibilità che modificazioni metaboliche cellulari possano contribuire alla resistenza ai farmaci antiretrovirali. In questo contesto riportiamo soltanto i risultati relativi alla resistenza al 3TC ed al d4T. Le cellule resistenti sono state ottenute *in vitro* dopo trattamento prolungato con i vari analoghi nucleosidici. Le cellule resistenti al 3TC (CEM3TC), non sono in grado di accumulare il farmaco in quantità paragonabili a quelle rilevate nella linea parentale. Questo fenomeno sembra essere dovuto ad una maggiore capacità delle CEM3TC di espellere il farmaco (30% vs 15% delle CEM). L'analisi di alcune proteine di membrana deputate alla espulsione di prodotti tossici quali Pgp, MRP1 e MRP4, ha rivelato che le cellule resistenti presentano una aumentata espressione solo della MRP4. Tuttavia in esperimenti di transfezione la MRP4 non ha mostrato alcun ruolo nella espulsione del 3TC. Al momento attuale quindi possiamo affermare che altri trasportatori potrebbero essere coinvolti in questo fenomeno. Per quanto riguarda la resistenza cellulare al d4T, le cellule coltivate in presenza di questo farmaco (CEMd4T) hanno acquisito un modesto, ma significativo, grado di resistenza alla attività antivirale e citotossica sia del d4T che dell'AZT. Il fenomeno sembra essere legato ad una ridotta attività della timidina chinasi. Tuttavia il grado di riduzione osservato (circa 3 volte) è molto modesto se paragonato alle 90 volte di riduzione osservate in una linea resistente all'AZT. I risultati ottenuti suggeriscono, quindi, che il d4T abbia, rispetto alla AZT, una minore capacità di selezionare cellule con un fenotipo resistente. Dal momento che questi composti sono ampiamente impiegati nell'uso clinico, abbiamo valutato la attività della TK in PBMC di soggetti in trattamento con HAART che includesse o la somministrazione del d4T o dell'AZT. I risultati, preliminari, sembrano confermare il dato *in vitro*. Infatti, pur nell'ambito di una elevata variabilità, nei soggetti trattati con AZT il valore medio di attività della TK è significativamente minore rispetto a quello rilevato nel gruppo trattato con d4T [HAART(AZT): TK=2.69±1.5; HAART(d4T): TK=4.03±1.8].

ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA DI TOSSINA COLERICA SU CELLULE WEHI-3B: SELEZIONE DI UN CLONE RESISTENTE.

Pessina Augusto*, Croera Cristina*, Giuliani Attilia§, Bayo Maria*, Neri Maria Grazia*.

*Istituto di Microbiologia, Università di Milano.

§ Dipartimento di Chimica e Biochimica Medica, Università di Milano.

La tossina colerica (TC) inibisce la proliferazione di molti tipi cellulari interferendo con diversi meccanismi di trasduzione del segnale che, nella maggior parte dei casi, utilizzano un ganglioside come recettore funzionale. I nostri precedenti studi hanno evidenziato che le linee cellulari mostrano una diversa sensibilità all'azione inibitoria della TC nella quale sono coinvolti diversi meccanismi anche opposti. Le cellule leucemiche L1210 sono sensibili alla TC, ma il trattamento non produce accumulo di cAMP. Al contrario, le cellule stromali SR-4987 mostrano, dopo il trattamento con TC, un notevole aumento di cAMP non accompagnato da alcuna inibizione della crescita cellulare. In un terzo modello, rappresentato da cellule WEHI-3B (leucemia mielomonocitica murina), il trattamento con TC provoca una drastica inibizione della proliferazione cellulare strettamente correlata con l'aumento intracellulare di cAMP.

Per dimostrare il ruolo del cAMP nelle cellule WEHI-3B, partendo dal ceppo parentale sensibile alla TC, abbiamo selezionato e stabilizzato un subclone resistente alla TC (WEHI-3B/CT/REV). Questo clone, regolarmente mantenuto in assenza di TC, presenta un elevato indice di resistenza (RI= 46.000) calcolato come rapporto tra i valori di IC50 osservati nel ceppo resistente e nel ceppo parentale. Nelle cellule WEHI-3B/CT/REV stimulate con TC non si è osservato alcun aumento di cAMP il cui accumulo è tuttavia indotto dal trattamento con Forskolina. Il legame della TC ai gangliosidi, studiato mediante cromatografia su strato sottile, ha dimostrato che nelle cellule resistenti scompariva lo spot corrispondente alla migrazione del ganglioside Gal-GalNac-GM1b. L'incorporazione di GM1a non era in grado di modificare l'indice di resistenza delle cellule WEHI-3B/CT/REV. Questi dati confermano che, nelle cellule WEHI-3B, il ganglioside Gal-GalNacGM1b è il più importante recettore funzionale per la TC, in grado di trasdurre il segnale provocando un aumento di cAMP che a sua volta induce una inibizione della crescita cellulare (probabilmente mediato dall'attivazione di una proteina chinasi cAMP dipendente). Questa linea cellulare resistente alla TC, derivata da un ceppo parentale sensibile, costituisce un nuovo e interessante modello cellulare per lo studio dei meccanismi di regolazione della crescita cellulare cAMP dipendenti.

ESPRESSIONE DI MOLECOLE SIMIL P-GLICOPROTEINA IN CEPPI DI *C. ALBICANS* RESISTENTI AGLI AGENTI AZOLICI

A. Molinari

Laboratorio di Ultrastrutture

Istituto Superiore di Sanità – Roma.

Sebbene alquanto rara nel recente passato, la resistenza agli agenti antifungini rappresenta oggi uno degli ostacoli maggiormente ricorrenti nel corso della terapia antimicotica. Per maggiore tollerabilità e facilità di somministrazione, vengono maggiormente utilizzati nel corso del trattamento delle infezioni fungine gli agenti azolici. La resistenza agli azoli è stata imputata a diversi meccanismi cellulari che comprendono: (i) alterazioni del target del farmaco (14 α -demetilasi); (ii) alterazioni della biosintesi dello contenuto in sterolo; (iii) espressione alterata del target dell'agente antifungino; (iv) aumentato efflusso degli antimicotici dovuto alla presenza di specifici trasportatori.

Come dimostrato da numerosi studi condotti su isolati clinici l'efflusso attivo degli agenti antimicotici rappresenta un importante meccanismo di resistenza agli agenti azolici. Sono stati identificati almeno due sistemi di trasporto: uno costituito da proteine appartenenti alla superfamiglia dei trasportatori MF (Major Facilitators), e l'altro da proteine appartenenti alla superfamiglia dei trasportatori ABC (ATP-Binding Cassette). La proteina BEN^r è un trasportatore MF implicato nella resistenza a diversi farmaci quali benomyl, metotressato e fluconazolo. Esempi di trasportatori ABC sono le proteine CDR1 e CDR2 coinvolte nel trasporto di diversi derivati degli azoli quali il fluconazolo, l'itraconazolo e il chetaconazolo. E' stata inoltre dimostrata in *Candida albicans* la presenza di geni che mostrano omologia di sequenza con il gene umano *MDR1* codificante per un trasportatore ABC, la P-glicoproteina (P-gp), la cui sovraespressione viene ritenuta responsabile dell'insorgenza della polifarmacoresistenza di molti tumori. In uno studio da noi condotto su ceppi di *C. albicans*, sensibili e resistenti agli agenti azolici, è stata dimostrata la presenza di un'attività di trasporto simil P-gp. Sotto la pressione selettiva del trattamento azolico tale attività aumenta significativamente, come dimostrato dai risultati ottenuti impiegando ceppi di *C. albicans*, resistenti al fluconazolo e all'itraconazolo, sia provenienti da pazienti AIDS sottoposti a trattamento farmacologico, sia selezionati *in vitro* dopo ripetuti passaggi in presenza degli agenti antifungini. Prove *in vivo* ed *in vitro* di sensibilità agli antimicotici, condotte in presenza di due agenti P-gp-modulanti, suggeriscono fortemente il coinvolgimento di una nuova attività di trasporto (simil P-gp) nei meccanismi di resistenza di *C. albicans* agli azoli.

CARATTERIZZAZIONE DI GENI CRY DI BACILLUS THURINGIENSIS PROVENIENTI DA DIVERSE LOCALITÀ GEOGRAFICHE MEDIANTE MULTIPLEX-PCR.

Paglietti B., Arora N., Scarpellini G., Mura M., Rubino S.

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia sperimentale e clinica, Università degli Studi di Sassari.

Una collezione di circa 600 ceppi di *Bacillus thuringiensis* isolati da campioni di terreno raccolti in diversi paesi del mondo quali Sardegna, Corsica (Europa), Angola, Zimbabwe (Africa), Argentina, Brasile (Sudamerica) sono stati caratterizzati tramite Multiplex PCR per la presenza di geni *cry* e *cyt*. Sono stati utilizzati 6 diverse paia di primers generali, disegnati su regioni altamente conservate di sequenze geniche che codificano per le diverse famiglie di proteine insetticide Cry 1, 2, 4, 8, 11 e Cyt note per essere tossiche in diversi ordini di insetti, principalmente Ditteri e Lepidotteri.

Il 31.7% dei ceppi è risultato positivo alla Multiplex PCR con una distribuzione variabile del contenuto di geni *cry*, rappresentando dei potenziali candidati per i test di tossicità. Tra i positivi i ceppi *cry* 1- *cry* 2 type sono i più rappresentati (47%) seguiti da *cry* 1 type e *cry* 11 (13%), gli altri quali *cry* 2,4,8 types e le varie combinazioni di *cry* 2-*cry* 8 e *cry* 8-*cry* 11 sono presenti in minima percentuale. Inoltre 33 ceppi tra i positivi hanno dato uno o più prodotti di PCR diversi dagli attesi indicando la presenza di possibili nuovi geni di *Bacillus thuringiensis*.

CARATTERIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTICRIPTOCOCCICA DI UN NUOVO DERIVATO PIRAZOLO-ISOTIAZOLICO

F. Barchiesi,¹ M.E. Milici,² D. Arzeni,¹ G. Pizzo,³ G. Giammanco,²

A.M. Shimizzi,¹ G. Scalise,¹ C.B. Vicentini⁴

Istituto di Malattie Infettive e Medicina Pubblica,¹ Università di Ancona; Istituto di Microbiologia,² Dipartimento di Discipline Odontostomatologiche,³ Università di Palermo; Dipartimento di Scienze Farmaceutiche,⁴ Università di Ferrara

Non abbiamo molte opzioni terapeutiche nelle infezioni sostenute da *Cryptococcus neoformans*. L'amfotericina B (AMB), sia nella formulazione "convenzionale" che in quelle "lipidiche", rappresenta ancora oggi il "gold standard" nella terapia di induzione della criptococcosi. Tollerabilità e/o alti costi di gestione rendono questo approccio terapeutico scarsamente maneggevole. Gli azolici, in particolar modo fluconazolo, hanno assunto un ruolo chiave sia nella fase di induzione che in quella di mantenimento. Tuttavia, per questo farmaco, sono stati recentemente descritti fenomeni di resistenza. L'introduzione di nuovi e potenti regimi terapeutici alternativi è quindi assolutamente necessario. In questo studio abbiamo valutato l'attività anticriptococcica di un nuovo derivato di sintesi pirazolico-isotiazolico (G8). Un primo screening mostrava che G8 alla concentrazione di 10 mg/ml inibiva la crescita di 11 dei 12 isolati clinici complessivamente testati (93%). Le MIC, effettuate con metodiche standard, erano comprese tra 4 e 16 mg/ml per G8 e 0.03 e 0.125 mg/ml per AMB. Le concentrazioni minime fungicide (MFC) risultavano una o due concentrazioni più elevate rispetto alle MIC per entrambi i farmaci. Le curve di "killing", eseguite nei ceppi 486 (MIC e MFC G8, 16 mg/ml) e 2337 (MIC e MFC G8, rispettivamente, 8 e 16 mg/ml) rivelavano una riduzione delle CFU/ml >99.9% rispetto all'inoculo iniziale a partire dalla ottava ora di esposizione a G8 a concentrazioni ³10 mg/ml ed erano paragonabili a quelle osservate con AMB a 1 mg/ml. Abbiamo infine confrontato l'efficacia di G8 con quella di AMB in un modello di criptococcosi sperimentale murina. Dopo 24 h dall'infezione con il ceppo 486, topi CD1 sono stati randomizzati nel gruppo di controllo e in vari gruppi di trattamento: AMB 0.3 mg/kg/die, G8 1 e 10 mg/kg/die. I farmaci sono stati somministrati per sette giorni consecutivi e gli animali osservati fino al giorno 30. Tutti i regimi terapeutici erano efficaci nel prolungare la sopravvivenza rispetto al gruppo di controllo ($P, <0.001 - <0.05$). AMB non è risultata più efficace né di G8 a 1 mg/kg/die ($P = 0.132$) né a 10 mg/kg/die ($P = 0.068$). Il nostro studio ha individuato una nuova molecola ad attività anticriptococcica a potenziale effetto fungicida.

DETERMINAZIONE DI CITOCINE OVINE NEL CORSO DI INFEZIONI DA AGENTI BATTERICI (*S. ABORTUSOVIS*) E VIRALI (BLUE TONGUE VIRUS).

Raffatellu M.¹, Chessa D.¹, Leori G.², Schianchi G.², Mannu F.³, Amedei A.⁴, Rubino S.¹

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia sperimentale e clinica, Università degli Studi di Sassari.

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari.

³ Nurex s.r.l., Sassari

⁴ Dipartimento di Medicina Interna, Università di Firenze.

E' stata messa a punto una metodica basata sulla RT-PCR, allo scopo di valutare l'espressione dei geni delle citochine ovine IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF α e della G3PDH in campioni di sangue di pecore spontaneamente infette da Blue Tongue virus (BTV), agente etiologico della omonima febbre catarrale, e di pecore gravide infettate con la *Salmonella abortusovis*, responsabile di aborto nell'ovino.

In tutti i campioni provenienti da ovini affetti da Blue tongue, è stata dimostrata l'espressione di IL-4 e IL-12, nella maggior parte di essi di IFN γ e TNF α ; in circa la metà dei casi si è avuta un'espressione di IL-1 β , mentre IL-10 e IL-6 sono state espresse in minor misura.

Nelle pecore gravide infettate con *S. abortusovis*, è stata dimostrata un'espressione di IL-12, IFN γ e TNF α , sia dopo l'infezione che al momento dell'aborto indotto, evidenziando una chiara risposta di tipo Th1.

Il nostro lavoro, pertanto, fornisce un contributo alla comprensione del sistema immunitario ovino e del suo ruolo nella risposta contro i suddetti patogeni. Infine, la metodica da noi impiegata, data la sua relativa semplicità, può essere applicata nello studio di altre patologie.

SUSCETTIBILITÀ IN VITRO AGLI ANTIMICOTICI: STANDARDIZZAZIONE DEI SAGGI E LORO RILEVANZA CLINICA.

Francesco Barchiesi

Istituto di Malattie Infettive e Medicina Pubblica, Università di Ancona

L'aumentata incidenza delle micosi sistemiche insieme all'introduzione di nuove opzioni terapeutiche hanno posto l'attenzione sui test di sensibilità in vitro per i farmaci antifungini. Il razionale di questi test è sovrapponibile a quello per gli antibiotici. Idelamente, infatti, un test in vitro dovrebbe: a) fornire dati sull' "attività relativa" di due o più antimicotici; b) fornire una correlazione tra la potenza in vitro e l'efficacia in vivo; c) essere in grado di monitorare, quando ripetuto sequenzialmente in infezioni subentranti dello stesso soggetto, lo sviluppo di "resistenza"; d) essere in grado di predire il potenziale terapeutico di molecole "nuove" in fase di sperimentazione pre-clinica. E' quindi sottinteso come sia di fondamentale importanza un metodo il più possibilmente standardizzato e quindi riproducibile. Vi sono vari fattori tecnici che influenzano i risultati di questi saggi. L'identificazione di alcune importanti variabili (es.: definizione della MIC, inoculo, terreno etc.) ha ridotto notevolmente la variabilità interlaboratoristica, ha permesso la standardizzazione di una metodica e la determinazione di "breakpoint" interpretativi per certe combinazioni farmaco/lievito. La correlazione tra un dato in vitro e l'esito clinico di una infezione micotica non è stata comunque completamente stabilita. Vi sono molti aspetti teorico-pratici da riconsiderare e molti altri da prendere in considerazione *de novo*. Siamo ancora ben lontani dal possedere, analogamente a quanto avvenuto già da tempo nel campo della batteriologia, un mezzo pratico di monitoraggio microbiologico. Si deve sottolineare come per le infezioni fungine, a differenza di quelle batteriche, la complessità dell'agente eziologico da testare (es: grande variabilità tra specie appartenenti allo stesso genere, tra differenti generi e tra lieviti e miceti filamentosi) e soprattutto la complessità dell'ospite che ne è affetto (es: miglioramento, persistenza o aggravamento della immunocompromissione di base) rendono estremamente difficile la realizzazione di un test semplice e maneggevole il cui valore predittivo sia inconfutabile.

LA PROTEINA PERR È COINVOLTA NELLA RISPOSTA ALLO STRESS OSSIDATIVO, NEL TRASPORTO DEL FERRO ED È NECESSARIA PER LA VIRULENZA DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Susanna Ricci ^{1,2}, Robert Janulczyk ¹, Gianni Pozzi ² e Lars Bjorck ¹

¹Sezione di Patogenicità Molecolare, Dipartimento di Biologia Molecolare e Cellulare (BMC), Università di Lund, Svezia e

²Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia (L.A.M.M.B.), Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Italia.

Le proteine appartenenti alla famiglia Fur (“Ferric Uptake Regulator”) sono regolatori trascrizionali tipici di batteri Gram-negativi, ma recentemente sono state identificate proteine Fur e Fur-simili (PerR, Zur) anche in organismi Gram-positivi. Questi regolatori, oltre ad essere cruciali nel controllo dell’omeostasi del ferro, sono implicati in molti altri processi: risposta a stress ossidativo e da acidi, regolazione di vie metaboliche, movimento e chemiotassi, espressione di determinanti di virulenza.

In questo lavoro abbiamo inattivato il gene *perR* di *Streptococcus pyogenes* ed abbiamo analizzato i fenotipi del mutante Δ *perR* SR301. In contrasto con tipici mutanti Δ *fur*, il ceppo SR301 ha evidenziato una minore capacità di assunzione di ⁵⁹Fe dal mezzo di coltura e l’analisi trascrizionale del sistema di trasporto ABC *mtsABC* ha dimostrato una ridotta espressione del gene *mtsA*, codificante per la proteina MtsA necessaria al trasporto di Fe e Zn. Questo diminuito trasporto di metalli non ha tuttavia modificato le capacità di crescita di SR301, che ha una velocità di crescita paragonabile al ceppo selvaggio sia in terreni ricchi che privati di cationi metallici. Il mutante Δ *perR* ha rivelato una spiccata resistenza al “challenge” con H₂O₂, confermando che PerR è coinvolto nella risposta inducibile ai perossidi. Contemporaneamente SR301 è invece risultato ipersensibile alla presenza dell’anione superossido, e tale ipersensibilità è stata collegata ad una ridotta espressione di *sodA*, codificante per l’unica superossido dismutasi (SOD) di *S. pyogenes*. I fenotipi di riduzione del trasporto di ferro, resistenza a H₂O₂ e ipersensibilità all’anione superossido sono stati completamente restaurati quando il gene selvatico *perR* è stato reintrodotta *in trans* nel ceppo SR301. Infine esperimenti di infezione condotti in topi BALB/c hanno dimostrato che Δ *perR* è attenuato nella virulenza di circa 10 volte rispetto al ceppo selvatico.

In conclusione, è possibile ipotizzare un ruolo di PerR come repressore di geni coinvolti nella risposta ai perossidi, probabile attivatore di SOD e di sistemi coinvolti nell’assunzione del ferro, ed infine PerR è importante per l’espressione di fattori di virulenza in *S. pyogenes*.

ERITROMICINO-RESISTENZA E VIRULENZA IN *STREPTOCOCCUS PYOGENES*: UN’ANALISI GENETICA.

VITALI L.A., RIPA S., PRENNA M., ZAMPALONI C.

Dipartimento di Biologia MCA, Cattedra in Microbiologia, Università di Camerino

INTRODUZIONE: Per eludere le difese dell’ospite e determinare l’infezione, lo *S. pyogenes* ha sviluppato svariati meccanismi di virulenza. Molti fattori di virulenza sono proteine di superficie e di secrezione espresse da geni appartenenti al regulone *mga* (“cluster *mga*”). Tra questi si trova il gene *emm* che esprime la proteina M. Essa rappresenta uno dei fattori di virulenza più conosciuti e il marker d’elezione per la tipizzazione sierologica dello *S. pyogenes*. Con il presente lavoro si è cercato di far luce sulla possibile correlazione tra resistenza ai macrolidi e determinanti di virulenza nello *S. pyogenes*.

METODI: 210 isolati clinici di *S. pyogenes* di cui 170 eritromicino-resistenti e 40 eritromicino-sensibili sono stati analizzati per i caratteri di resistenza e virulenza. I 170 ceppi resistenti, già fenotipicamente caratterizzati, sono stati sottoposti a PCR per la ricerca dei determinanti genetici di resistenza ai macrolidi. In tutti i ceppi sia sensibili che resistenti è stata poi valutata la variabilità della proteina M. A tal fine ci si è avvalsi di un nuovo approccio molecolare per la rilevazione del gene *emm* denominato “PCR-M-typing”. Successivamente i ceppi positivi al “PCR-M-typing” sono stati sottoposti al “Vir-typing”, metodo che valuta il polimorfismo del profilo di restrizione enzimatica del DNA del cluster genico *mga*.

RISULTATI: La ricerca dei determinanti di resistenza sui 170 isolati resistenti di *S. pyogenes*, ha confermato l’attesa corrispondenza tra fenotipo e gene di resistenza. La tecnica del “PCR-M-typing” ha permesso, con una batteria di soli 17 oligonucleotidi *emm*-specifici (tipi 1,2,3,4,5,6,8,11,12,18,22,24,28,29,78,87,89), di tipizzare circa il 80% dei ceppi resistenti e l’85% dei ceppi sensibili. La distribuzione delle frequenze del determinante genetico per il fattore di virulenza M è risultata significativamente differente nella popolazione di *S. pyogenes* eritromicino-resistente rispetto a quella della popolazione sensibile. Tale distribuzione ha inoltre mostrato una interessante correlazione con il polimorfismo del regulone *mga*.

CONCLUSIONI: I dati ottenuti suggeriscono che i determinanti genetici della resistenza e della virulenza batterica non siano selezionati in maniera indipendente nel corso dell’infezione. La correlazione esistente tra tipo M e “vir-type” pone le basi per il potenziale utilizzo della sola tipizzazione M come strumento di una prima valutazione della virulenza legata al cluster genico *mga*.

UN APPROCCIO INNOVATIVO PER UNA PIÙ EFFICACE DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ MICROBIOLOGICA DELL'ACQUA DEL LAGO DI GARDA.

C. Signoretto¹, M.M. Lleò¹, G. Burlacchini¹, G. Franzini² e P. Canepari¹

Dipartimento di Patologia-Sezione di Microbiologia dell'Università di Verona¹ e Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto (ARPAV) di Verona²

Da tempo i saggi utilizzati di routine per la determinazione della qualità microbiologica dell'acqua per uso umano, i quali prevedono l'identificazione dei batteri solo attraverso la loro coltivazione, sono oggetto di severe critiche in quanto non adeguati alla protezione della salute dell'uomo. Tali critiche sono suffragate dalla recente individuazione di particolari strategie di sopravvivenza attivate dai batteri eutrofici in condizioni ambientali avverse. Tra queste strategie è utile citare lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC) e la possibilità che i batteri possano aderire a microrganismi dello zoo-plancton con la creazione di un potenziale serbatoio di batteri patogeni. Queste critiche sono anche motivate dall'osservazione che rimane sconosciuto l'agente eziologico in circa il 50% delle infezioni propiziate dall'uso dell'acqua. In questo lavoro noi valutiamo l'importanza dei due parametri sopracitati nel migliorare la qualità e l'efficacia dei test microbiologici ambientali mediante uno studio microbiologico della durata di 18 mesi su campioni di acqua prelevata da uno specifico sito del Lago di Garda. L'obiettivo di questa ricerca è duplice: da un lato la determinazione del ruolo dello zoo-plancton lacustre come serbatoio di patogeni umani e dall'altra l'applicazione di tecniche di biologia molecolare per il rilevamento anche di batteri in stato VBNC sia liberi che associati al plancton. I dati preliminarmente raccolti nel corso dei primi 6 mesi dell'indagine mostrano che all'aumentare della fauna planctonica lacustre aumenta il numero dei patogeni e degli indicatori di inquinamento fecale ad essa adesi. Inoltre, la ricerca mediante PCR di specifiche sequenze di *Enterococcus faecalis* ed *Escherichia coli* ha messo in luce un elevato numero di campioni negativi all'esame colturale ma positivi alla ricerca con la tecnica di biologia molecolare. Nel loro insieme i dati, seppure ancora preliminari, forniscono una utile indicazione sulla necessità di adeguare le tradizionali tecniche microbiologiche con la ricerca dei patogeni associati al plancton lacustre ma anche con l'inserimento di tecniche di biologia molecolare o comunque di tecniche che non necessitino della coltivazione dei microrganismi nel campione ambientale.

MICROBIODIVERSITÀ DI AMBIENTI NATURALI, UN APPROCCIO DI TASSONOMIA MOLECOLARE

Elena Vendramin, Alessandra Cagnazzo e Andrea Squartini

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Padova, Strada Romea 16, 35020, Legnaro, Padova. E-mail: squart@unipd.it

È stato effettuato uno studio della diversità biologica dei procarioti planctonici nel lago del Colbricon superiore (Parco Nazionale Pale di S. Martino-Paneveggio). La comunità microbica lacustre, al pari di quelle della maggior parte degli ambienti, presenta il problema di essere quasi completamente non-coltivabile su piastre con mezzi nutritivi di uso batteriologico. Nell'impossibilità di ottenere colonie e caratterizzare i batteri isolati per via microbiologica tradizionale, si è proceduto con un approccio molecolare consistente in: (a) filtrazione di acqua di lago per la raccolta delle cellule; (b) lisi delle stesse e liberazione degli acidi nucleici; (c) amplificazione via reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) del gene per la subunità piccola dell'RNA ribosomale; (d) clonaggio dei frammenti amplificati in vettori plasmidici; (e) trasformazione via elettroporazione di *Escherichia coli* e ottenimento di una banca genica rappresentativa della comunità microbica iniziale; (f) analisi dei cloni mediante comparazione elettroforetica del polimorfismo di restrizione con enzimi diagnostici per la regione dell' rRNA (ARDRA); (g) sequenziamento nucleotidico dei cloni numericamente dominanti; (h) comparazione al computer delle sequenze contro banche dati del Progetto Ribosoma contenenti tutte le sequenze sinora note per i procarioti e identificazione putativa di genere e specie dei batteri presenti nel lago. I risultati di un campionamento effettuato in novembre mostrano, da una popolazione quantitativamente pari a circa 10^5 cellule per ml, nell'analisi di 70 cloni, una comunità comprendente 30 diversi taxa, dominata da *Rhodospirillum photometricum* (25%) *Stenotrophomonas maltophilia* (11%) e *Ochrobactrum sp.* (10%). I rimanenti taxa risultano presenti a frequenze inferiori al 4%. A titolo di controllo la popolazione coltivabile su piastre di agar per conta batterica è stata rilevata ammontare allo 0.01% della popolazione totale e comprende, quali taxa più frequenti, *Methylobacterium sp.*, *Sphingomonas echinoides*, *Microbacterium sp.*, e *Clavibacter michiganensis*. Si è inoltre proceduto allo studio dello stesso ambiente con un approccio alternativo di recente introduzione volto ad apprezzare in maniera sinottica la diversità dei membri della comunità microbica attraverso la gel-elettroforesi in gradiente denaturante degli amplificati del gene per l'RNA ribosomale (DGGE).

ATTIVITA' ANTI-ADENOVIRUS DELLA LATTOFERRINA

F. Superti¹, D. Arnold², A. M. Di Biase¹, M. Marchetti¹, A. Pietrantonì¹, P. Valenti³, L. Seganti²

¹Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

²Istituto di Microbiologia, Università "La Sapienza", Roma

³Istituto di Microbiologia, II Università di Napoli, Napoli.

E' noto che i bambini allattati al seno contraggono infezioni intestinali e respiratorie in misura significativamente minore rispetto ai bambini allattati con latte artificiale. E' stato dimostrato che l'attività protettiva del latte umano, per lungo tempo attribuita esclusivamente alla presenza di IgA secretorie, può essere mediata anche da altri componenti di natura proteica, quali ad esempio la lattoferrina. La lattoferrina è una glicoproteina monomerica del peso molecolare di circa 80 kDa appartenente al gruppo delle transferrine. Questa proteina, sintetizzata dai neutrofili e dalle cellule della mucosa epiteliale, è stata isolata per la prima volta dal latte e può essere ritrovata in molte altre secrezioni esocrine come lacrime, saliva, bile e succo pancreatico. La lattoferrina svolge un ruolo importante oltre che nel metabolismo del ferro anche nei meccanismi di difesa dell'ospite verso diversi patogeni, sia direttamente che attraverso la regolazione della risposta infiammatoria. Nostri studi recenti hanno dimostrato che questa proteina è in grado di inibire l'infezione da herpesvirus, rotavirus e poliovirus. In questa ricerca abbiamo studiato l'effetto della lattoferrina da latte bovino, (apo, nativa o saturata con diversi metalli) e della lattoferrina da latte umano (nativa) sull'infezione da adenovirus in vitro. Come modello di studio è stato utilizzato l'adenovirus di tipo 2, responsabile di infezioni sia respiratorie che gastrointestinali. L'attività delle diverse lattoferrine è stata confrontata con quella di altre proteine del latte quali la mucina, l'alfa-lattoalbumina e la beta-lattoglobulina. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'infezione virale viene inibita solo in seguito al trattamento con lattoferrina. La lattoferrina mostrava un'attività anti-adenovirus dose-dipendente che non era influenzata in modo significativo dal grado o dal tipo di saturazione in metalli della molecola. Esperimenti in cui la lattoferrina veniva incubata con le cellule durante fasi diverse dell'infezione virale hanno dimostrato che l'inibizione si esplica su una fase precoce dell'infezione poiché la sintesi di antigeni virali veniva inibita non solo quando la glicoproteina era presente durante l'intero ciclo replicativo ma anche quando questa era aggiunta alle cellule prima o durante la fase di adsorbimento virale.

CARATTERIZZAZIONE ULTRASTRUTTURALE DI CELLULE INFETTATE DA HERPESVIRUS UMANO 8

°A. Tinari, °M. Marchetti, *P. Monini, *B. Ensoli, °F. Superti

Laboratorio di Ultrastrutture° e Laboratorio di Virologia*, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'Herpesvirus umano 8 (HHV-8) è un gamma-Herpesvirus associato a diverse patologie tra le quali linfomi ad effusione primaria (PEL) e sarcoma di Kaposi (KS). In questa ricerca abbiamo analizzato a livello ultrastrutturale due aspetti diversi dell'interazione tra HHV-8 e cellule ospiti: l'infezione produttiva e l'infezione latente. La replicazione litica è stata studiata in cellule BCBL-1 (Body Cavity Based Lymphoma), una linea cellulare, derivata da PEL, infettata latentemente da HHV-8. Al fine di caratterizzare a livello ultrastrutturale la morfogenesi virale, la produzione di virioni maturi è stata indotta dal trattamento con esteri del forbolo (TPA). I risultati di questi studi hanno dimostrato che la replicazione litica di HHV-8 induceva numerose alterazioni nei diversi compartimenti cellulari e in particolare nel nucleo. Inclusioni elettrondense riconducibili a materiale virale e capsidi nudi sono stati osservati a livello nucleare mentre nel citoplasma le particelle virali apparivano come capsidi nudi, con tegumento o particelle complete di rivestimento. Nonostante siano state osservate gemmazioni dalle membrane nucleari, la maturazione del virus avveniva a livello del sistema membranoso citoplasmatico poiché particelle dotate di tegumento sono state osservate esclusivamente nel citoplasma o all'esterno delle cellule. Ulteriori studi morfologici sono stati condotti sulle cellule fusiformi trasformate del KS (cellule "spindle"), infettate latentemente da HHV-8. Sono state analizzate cellule "spindle" endoteliali di origine vascolare e linfatica isolate da lesioni KS e le caratteristiche ultrastrutturali sono state confrontate con quelle di cellule endoteliali macrovascolari umane (HUVEC). Le cellule "spindle" contenevano numerose inclusioni citoplasmatiche osmiofile, solo occasionalmente osservate nelle cellule HUVEC. Al microscopio elettronico il reticolo endoplasmatico rugoso di tutti i tipi cellulari analizzati appariva ben sviluppato e dilatato, contenente una matrice elettrondensa indice di uno stato di attiva sintesi. Sia nelle cellule "spindle" di origine endoteliale che nelle cellule HUVEC sono stati osservati mitocondri in fase attiva di dimensioni molto ridotte. In tutti e tre i tipi cellulari analizzati non sono state osservate neoformazioni di origine virale. Nell'insieme, i risultati di questi studi contribuiscono ad ampliare le conoscenze relative ai differenti aspetti morfologici delle cellule infettate produttivamente e latentemente da HHV-8.

STRETTA ASSOCIAZIONE DI *ERM(AM)* CON *TET(M)* E DI *ERM(TR)* E *MEF(A)* CON *TET(O)* IN CEPPI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES* RESISTENTI ALL'ERITROMICINA E ALLA TETRACICLINA

E. Giovanetti, A. Brenciani, R. Lupidi, M.C. Roberts¹ e P.E. Varaldo

Ist. di Microbiologia, Università degli Studi di Ancona;

¹*Dept. of Pathobiology, University of Washington, Seattle, WA*

Background: In *S. pyogenes* la resistenza all'eritromicina è mediata da metilasi codificate dai geni *erm(AM)* o *erm(TR)*, o da un sistema di efflusso codificato dal gene *mef(A)*. La resistenza alla tetraciclina si osserva in circa il 70% dei ceppi *erm(AM)*-positivi di fenotipo costitutivo cMLS (quelli di fenotipo inducibile [iMLS-A] sono invariabilmente tetraciclino-sensibili); in >90% dei ceppi *erm(TR)*-positivi; e in circa il 70% dei ceppi con eritromicina-resistenza da efflusso (fenotipo M).

Metodi: Sono stati analizzati 61 isolati di *S. pyogenes* resistenti sia all'eritromicina (MIC, =1 µg/ml) che alla tetraciclina (MIC, =8 µg/ml). I geni di resistenza sono stati rilevati mediante PCR e confermati mediante ibridizzazione con sonde specifiche. Esperimenti di coniugazione sono stati condotti per studiare la trasferibilità dei vari determinanti.

Risultati: Tutti i ceppi *erm(AM)* positivi (n = 16) possedevano il gene *tet(M)*, mentre tutti i ceppi *erm(TR)*-positivi (n = 27) avevano il gene *tet(O)* [due ceppi iMLS-B erano positivi anche per *tet(M)*]. Tutti gli isolati di fenotipo M, ossia con eritromicina-resistenza da efflusso codificata dal gene *mef(A)* (n = 18), presentavano il gene *tet(O)*.

In esperimenti di coniugazione non abbiamo osservato un co-trasferimento dei geni *erm(TR)* e *tet(O)*; abbiamo invece osservato un co-trasferimento dei geni *mef(A)* e *tet(O)*.

Conclusioni: Abbiamo trovato in *S. pyogenes* una stretta associazione tra i geni *erm(AM)* con *tet(M)* nei ceppi cMLS e di *erm(TR)* e *mef(A)* con *tet(O)* rispettivamente nei ceppi di fenotipo inducibile iMLS-B e iMLS-C e nei ceppi di fenotipo M. Mentre l'associazione tra *erm(AM)* e *tet(M)* è nota e se ne conoscono in gran parte le basi genetiche, *tet(O)* non è mai stato descritto prima in *S. pyogenes*, tantomeno in associazione a geni di eritromicina-resistenza. Il trasferimento simultaneo e alla stessa frequenza di *mef(A)* e *tet(O)* suggerisce una contiguità dei due geni sul cromosoma di *S. pyogenes*. Meno chiare sono invece le basi genetiche dell'associazione tra i geni *erm(TR)* e *tet(O)*.

STUDIO COMPARATIVO DELLE INTERAZIONI TRA VIRUS INFLUENZA A/WSN/33 E FILAMENTI DI ACTINA IN DUE DIVERSI MODELLI CELLULARI

Arcangeletti M.C., De Conto F., Ferraglia F., Pinardi F., Medici M.C., Valcavi P., Martinelli M., Calderaro A., Géraud G.*, Scherrer K.*, Chezzi C., Dettori G.

Sezione di Microbiologia – Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio – Università degli Studi di Parma – Viale A. Gramsci, 14 – 43100 Parma – Italia

**Institut Jacques Monod – Université Paris 7 – 2, Place Jussieu – Parigi – Francia*

Il virus dell'influenza ha sviluppato numerosi meccanismi per poter sfruttare specifiche funzioni dell'ospite, verosimilmente diverse, dipendentemente dal tipo di cellula infettata.

In particolare, è stato dimostrato che la distribuzione differenziale delle ribonucleoproteine virali, in grado di localizzarsi alternativamente a livello nucleare, come anche citoplasmatico, in rapporto alle diverse fasi del ciclo replicativo del virus influenzale, necessita di meccanismi di regolazione, agenti anche attraverso l'associazione della nucleoproteina (NP) virale con il citoscheletro, in particolare con i filamenti di actina.

In questo studio, uno stipe umano di virus influenza A (A/WSN/33), propagato in cavità allantoidea di uova embrionate di pollo, è stato utilizzato per l'infezione in vitro di linee cellulari di mammifero, MDCK (rene di cane) e LLC-MK2 (rene di scimmia).

La ricerca intrapresa si è prefissa di valutare le interazioni esistenti tra NP virale e filamenti di actina, facendo riferimento, in particolare, agli stadi precoci dell'infezione. I risultati ottenuti evidenziano una netta interazione (di tipo diretto o indiretto) tra la suddetta proteina virale ed il sistema citoscheletrico di actina, molto evidente in LLC-MK2 durante gli stadi precoci del ciclo infettivo ed assenza di interazione in cellule MDCK durante gli stessi tempi. In quest'ultimo sistema, inoltre, il ciclo replicativo del virus A/WSN/33 sembra essere significativamente più efficiente che in LLC-MK2.

I dati ottenuti rendono verosimile l'ipotesi che l'interazione tra virus influenza A e filamenti di actina possa funzionare come segnale di localizzazione citoplasmatica del virus in specifici tipi cellulari, condizionandone il trasporto verso il nucleo.

VALUTAZIONE COMPARATIVA DELLA CAPACITA' REPLICATIVA DEL VIRUS INFLUENZA A/WSN/33 DURANTE PASSAGGI SERIALI IN DUE LINEE CELLULARI DI MAMMIFERO *IN VITRO*

Arcangeletti M.C., De Conto F., Ferraglia F., Pinardi F., Medici M.C., Valcavi P., Martinelli M., Calderaro A., Géraud G.*, Scherrer K.*, Chezzi C., Dettori G.

Sezione di Microbiologia – Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio – Università degli Studi di Parma – Viale A. Gramsci, 14 – 43100 Parma – Italia

**Institut Jacques Monod – Université Paris 7 – 2, Place Jussieu – Parigi – Francia*

Stipiti di virus influenzale riprodotti in linee cellulari di mammifero presentano caratteristiche antigeniche almeno parzialmente diversificate rispetto a quelle degli stessi ceppi riprodotti in uova embrionate; tale fenomeno sembra riconducibile alla comparsa e alla selezione di varianti.

E' verosimile che l'insorgenza di tali sottopopolazioni possa modulare anche l'efficienza del ciclo replicativo virale in modelli cellulari diversi, non solo a livello del seppure fondamentale riconoscimento dei recettori di membrana dell'ospite, ma anche per la possibilità (o, alternativamente, l'impossibilità) da parte del virus di cooptare altre strutture/funzioni della cellula infettata, quali il citoscheletro.

In questo studio è stata valutata comparativamente la capacità replicativa di uno stipite umano di virus influenza A (A/WSN/33), riprodotto in cavità allantoidea di uova embrionate di pollo, durante diversi passaggi seriali in due linee cellulari di mammifero, MDCK (rene di cane) e LLC-MK2 (rene di scimmia). I risultati ottenuti mettono in evidenza una diversa capacità, da parte del suddetto stipite virale, di intraprendere diversi cicli replicativi nei due modelli cellulari impiegati. In particolare, l'efficacia di reinfezione rimane elevata in MDCK, mentre sembra significativamente diminuita in LLC-MK2. In quest'ultimo modello cellulare è stata anche evidenziata una significativa interazione tra il sistema citoscheletrico di actina ed il suddetto virus influenzale e come la modificazione di assetto fisiologico dei filamenti di actina, quale quella indotta da citocalasina D, possa risolvere il "blocco" dell'infezione, suggerendo un ruolo importante del citoscheletro nell'influenzare l'evoluzione.

LOCALIZZAZIONE DELL'ACIDO NUCLEICO E DI PROTEINE DI CITOMEGALOVIRUS UMANO A LIVELLO DI MATRICE NUCLEARE IN CORSO DI INFEZIONE DI FIBROBLASTI EMBRIONALI UMANI *IN VITRO*

Arcangeletti M.C., De Conto F., Ferraglia F., Pinardi F., Medici M.C., Valcavi P., Martinelli M., Calderaro A., Razin S.*, Scherrer K.*, Chezzi C., Dettori G.

Sezione di Microbiologia – Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio – Università degli Studi di Parma – Viale A. Gramsci, 14 – 43100 Parma – Italia

**Institut Jacques Monod – Université Paris 7 – 2, Place Jussieu – Parigi – Francia*

L'organizzazione nucleare della cellula svolge, come è noto, un ruolo cruciale durante l'infezione da parte di quei virus, quali citomegalovirus, il cui ciclo replicativo si attua prevalentemente in tale compartimento cellulare. E' verosimile che il complesso gioco di equilibri che può portare alla sopraffazione rapida dell'ospite, all'insediamento "silente" del virus infettante, o ad uno stato di resistenza cellulare all'infezione preveda lo sfruttamento differenziale, da parte di citomegalovirus, di percorsi e di funzioni normalmente utilizzate dall'ospite in condizioni fisiologiche. La matrice nucleare, in particolare, svolge un ruolo di primo piano non solo da un punto di vista esclusivamente strutturale, ma anche regolatorio. E' nota, infatti, l'associazione alla matrice nucleare di acidi nucleici e di complessi multienzimatici cellulari, direttamente implicati negli eventi di replicazione genica, di trascrizione e di maturazione dei trascritti.

Lo studio intrapreso si è proposto di verificare l'interazione a livello di matrice nucleare, di uno stipite umano di citomegalovirus (HCMV) in corso di infezione produttiva di fibroblasti embrionali umani *in vitro*.

I dati ottenuti durante il ciclo di replicazione virale hanno messo in evidenza una netta e graduale associazione alla matrice nucleare sia di antigeni di HCMV ad attività enzimatica sia di proteine strutturali, con localizzazioni differenziali e caratteristiche, dipendentemente dal tipo di proteina virale considerata. Di particolare rilievo è anche l'osservazione di una specifica interazione tra matrice nucleare e DNA virale.

STUDIO DI PROPRIETÀ CORRELATE ALLA VIRULENZA IN CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATI DA PAZIENTI AFFETTI DA EMOPATIE MALIGNI

M. PENTA^a, C. LONGHI^a, M. P. CONTE^a, C. GIRMENIA^b, L. SEGANTI^{a*}

^a Dipartimento Scienze di Sanità Pubblica, ^b Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università "La Sapienza", Roma

Listeria monocytogenes è un batterio Gram positivo, intracellulare facoltativo, ampiamente diffuso in natura, responsabile di gravi infezioni veicolate da alimenti. Esso può essere definito un patogeno opportunistico in quanto la maggior parte dei pazienti affetti da listeriosi possiede alterazioni a carico dell'immunità cellulare mediata dai linfociti T. La suscettibilità dell'ospite svolge un ruolo importante nelle diverse forme cliniche di listeriosi. Nel 75 % degli adulti non in gravidanza la listeriosi è associata a patologie neoplastiche (leucemie, linfomi, sarcomi) e a terapie immunosoppressive, con una mortalità del 70 %. La virulenza di *L. monocytogenes* è legata alla sua capacità di invadere e di moltiplicarsi in cellule epiteliali e in macrofagi residenti. Nell'ospite immunocompromesso i batteri si moltiplicano nel fegato, nella milza e raggiungono gli organi bersaglio. In studi condotti sia *in vitro* che *in vivo* è stata osservata una notevole variabilità nel potere patogeno di *L. monocytogenes* e non è stata ancora individuata una chiara correlazione tra il grado di virulenza e l'origine dei ceppi isolati. In questa ricerca sono stati presi in esame dieci ceppi (E1-E10) isolati dal sangue e dal liquor di pazienti affetti da emopatie maligne sottoposti a chemioterapia intensiva o trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, presso il Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, e due ceppi di riferimento, LM2 isolato da una sepsi neonatale e ATCC 7644. Sono stati determinati il sierotipo, la proprietà emolitica, la sopravvivenza in ambiente acido, la capacità di invadere e di moltiplicarsi in cellule intestinali in coltura e il polimorfismo allelico relativo al gene *actA*, fondamentale per la moltiplicazione intracellulare. I risultati ottenuti hanno mostrato che il 50 % dei ceppi in esame apparteneva al sierotipo 1 e il restante 50% al sierotipo 4. Tutti i ceppi erano emolitici e tra questi E 6, E 7, E 8, E 9, dotati di attività emolitica elevata, mostravano anche una risposta acido tollerante ed un' aumentata capacità invasiva. L'esame del polimorfismo allelico del gene *actA* non era correlabile con la diversa capacità di moltiplicazione intracellulare dei ceppi in esame. Questo studio suggerisce una forte associazione tra le proprietà invasive degli isolati clinici e la loro capacità di sopravvivere a pH letali.

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA E FUNZIONALE DI CELLULE NATURAL KILLER ATTIVATE DA *MYCOBACTERIUM BOVIS*, BACILLO DI CALMETTE E GUÉRIN (BCG) NELL'UOMO

Batoni G., Esin S., Pardini M., Bottai D., Maisetta G., Florio W., Campa M.

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa

Negli ultimi anni, numerose evidenze sperimentali hanno indicato che, oltre all'immunità antigene-specifica, anche i componenti dell'immunità innata o naturale ed, in particolare, le cellule *natural killer* (NK), rappresentano importanti mediatori della difesa contro una serie di agenti patogeni, incluso i micobatteri. È stato dimostrato che le cellule NK contribuiscono alla resistenza alle infezioni attraverso molteplici meccanismi quali la secrezione di citochine immunoregolatorie, la lisi delle cellule infette ed, in alcuni casi, l'inibizione diretta della crescita dei microrganismi infettivi.

Nel presente studio, si è proceduto alla caratterizzazione fenotipica e funzionale di cellule NK umane, stimulate *in vitro* con BCG intatto o con antigeni parietali da esso ottenuti, mediante analisi dell'espressione di marker di attivazione, della produzione di citochine immunoregolatorie (IFN-gamma, IL-2, IL-4) e dell'attività proliferativa e citotossica di tali cellule. Popolazioni arricchite in cellule NK sono state ottenute da cellule mononucleate di sangue periferico di soggetti sani sensibilizzati o meno ad antigeni micobatterici, utilizzando un sistema di purificazione per selezione negativa che fa uso di biglie magnetiche covalentemente legate ad anticorpi contro i marker di superficie delle popolazioni cellulari da eliminare. I risultati ottenuti hanno dimostrato che in colture deplete di macrofagi e linfociti B sia BCG vivo che BCG ucciso al calore inducevano proliferazione di cellule CD56⁺/CD3⁺ (cellule NK); tale proliferazione non richiedeva una precedente esposizione ad antigeni micobatterici, ma era dipendente da un contatto batteri-cellule, in quanto era completamente abrogata dall'interposizione di una membrana con pori di 0.2 µm di diametro tra le popolazioni cellulari e le cellule batteriche. Circa il 40% delle cellule NK stimulate con BCG esprimeva anche il marker di superficie CD25 (recettore dell'IL-2) indicando la loro attivazione in seguito al contatto con i batteri. L'analisi della produzione di citochine intracitoplasmatiche mediante citometria a flusso (FACS) ha, inoltre, dimostrato che, in seguito a stimolazione con BCG vivo, ed in minore misura con antigeni parietali, circa il 60% delle cellule produttrici di IFN-gamma era rappresentato da cellule NK che presentavano un picco nella produzione di tale citochina dopo 18-24 ore di coltura. Infine, le cellule NK stimulate dal contatto con i batteri erano in grado di indurre l'espressione di marker di apoptosi o di morte su cellule target (K562), sempre valutata con analisi al FACS. Tali risultati, nel loro insieme, sembrano indicare che, analogamente a quanto descritto per altri microrganismi, possa verificarsi un'interazione diretta tra cellule NK e micobatteri attraverso componenti della superficie batterica, interazione che potrebbe avere un ruolo importante nelle prime fasi dell'infezione.

ALLESTIMENTO DI UN SAGGIO DI RT-PCR NESTED PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINE MICOBATTERICHE IN CAMPIONI DI ESPETTORATO

Bottai D., Maisetta G., Batoni G., Esin S., Pardini M., Florio W., Rindi L., Garzelli C., Campa M.
*Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia
Università degli Studi di Pisa*

Negli ultimi anni, lo studio dei geni espressi da *Mycobacterium tuberculosis* nell'ambiente intracellulare o direttamente nel sito di infezione ha assunto un grande interesse, al fine di identificare quei geni che sono richiesti dal microrganismo stesso per la crescita durante il corso dell'infezione naturale. L'analisi dei geni espressi nell'espettorato è stata inoltre proposta per l'allestimento di tecniche diagnostiche rapide, che utilizzino la rilevazione di mRNA per proteine micobatteriche come marcatore della presenza di bacilli vitali.

Recentemente, nel nostro laboratorio, è stata identificata una nuova proteina di secrezione di 8.3 kDa, SA5K, rilasciata nei filtrati di coltura da *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG e da poche altre specie di micobatteri, ed espressa dal BCG durante la crescita intracellulare.

Al fine di valutare se il gene per SA5K fosse espresso dal bacillo tubercolare anche nel corso dell'infezione, è stato allestito un saggio di RT-PCR *nested*, per la rivelazione dell'mRNA estratto da *M. tuberculosis* presente in campioni di espettorato. Oltre al gene per SA5K, negli stessi campioni, è stata valutata la presenza: i) dell'mRNA per l'antigene 85B, l'unico per il quale sia stata dimostrata, fino ad oggi, l'espressione nell'espettorato di soggetti affetti da tubercolosi polmonare; ii) dell'rRNA 16S, come controllo dell'efficienza delle procedure di estrazione e di amplificazione. Il limite di sensibilità del saggio è stato determinato, per ciascuno dei geni analizzati, inoculando in quantità scalari, un numero noto di CFU di BCG coltivato *in vitro* in un *pool* di espettorati risultati negativi all'esame colturale per la ricerca di *M. tuberculosis*. Il limite di sensibilità del saggio è risultato di 1.2×10^3 CFU/ml di espettorato per il gene di SA5K, e di 1.2×10^4 CFU/ml di espettorato per quello dell'antigene 85B. L'espressione di tali geni è stata valutata in 11 campioni di espettorato, raccolti prima dell'inizio della terapia e risultati positivi all'esame microscopico e colturale. Tra i campioni analizzati, almeno 7 sono risultati positivi per l'espressione del gene di SA5K e almeno 4 per l'espressione del gene dell'antigene 85B. Nel loro insieme, i dati ottenuti suggeriscono che il gene di SA5K venga espresso *in vivo* da *M. tuberculosis* e che la proteina possa avere un ruolo nel corso dell'infezione.

LA CARIOTIPIZZAZIONE QUALE PARAMETRO PREDITTIVO DELLA VIRULENZA DI *CANDIDA ALBICANS*

A. Tavanti, A. Lupetti, P. Davini, G. Pardini, D. Campa, S. Senesi
Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa

Nei lieviti, per i quali non è stata dimostrata una riproduzione sessuata, sono frequenti, nell'ambito della specie, assetti cariologici variabili che vengono clonalmente conservati durante la propagazione vegetativa. Per tale motivo, la definizione del cariotipo viene assunta come carattere discriminativo intraspecifico applicabile a studi di epidemiologia genetica dei lieviti patogeni opportunisti. Precedenti studi di cariotipizzazione hanno portato alla identificazione di sette cariotipi distinti di *Candida albicans* (a, b, c, d, x, y, z), dei quali due, i cariotipi b e c, sono quelli più rappresentativi della specie, costituendo da soli il 70% degli isolati clinici. Tali studi hanno suggerito, inoltre, che i ceppi aventi cariotipo c potrebbero essere potenzialmente più virulenti in quanto producono livelli di aspartil-proteasi secretorie, riconosciute quali fattori di virulenza di *C. albicans*, significativamente più elevati rispetto ai ceppi aventi cariotipo b. A tale scopo, è stata analizzata la diversa virulenza e patogenicità dei due cariotipi più frequentemente isolati, in due diverse condizioni sperimentali: in un modello di infezione *ex vivo* ed in un modello murino di candidosi vaginale. I risultati ottenuti con il modello *ex vivo* hanno dimostrato che: (1) i ceppi aventi cariotipo b vengono fagocitati più efficacemente rispetto ai ceppi aventi cariotipo c; (2) che i ceppi aventi cariotipo b sono più sensibili al killing rispetto ai ceppi aventi cariotipo c; e (3) che i ceppi aventi cariotipo c si replicano attivamente all'interno dei macrofagi. Inoltre, mediante RT-PCR, è stata analizzata l'espressione dei geni SAP1-7 nei ceppi di *C. albicans* recuperati in seguito a lisi dei macrofagi: i ceppi aventi cariotipo b esprimono soltanto i geni SAP1 e SAP4/6, mentre, nei ceppi aventi cariotipo c, risultano espressi tutti i geni SAP, ad eccezione di SAP7. I dati ottenuti utilizzando il modello murino di candidosi vaginale avvalorano ulteriormente l'ipotesi di una maggiore virulenza del cariotipo c rispetto al cariotipo b: nei topi inoculati con il cariotipo c, infatti, l'infezione risulta caratterizzata da una carica infettante più elevata e da una maggiore persistenza rispetto ai topi inoculati con il cariotipo b. I risultati ottenuti costituiscono la prima evidenza sperimentale che la cariotipizzazione può costituire un valido strumento per condurre studi di fine epidemiologia molecolare di tale lievito opportunisto.

POTENZIALE REDOX NELL'ATTIVITA' CANDIDACIDA DEL PEPTIDE N-TERMINALE DELLA LATTOFERRINA UMANA

^{1,2}Antonella Lupetti, ²Arianna Tavanti, ¹Akke Paulusma-Annema, ²Sonia Senesi, ²Mario Campa, ¹Jaap T. van Dissel, and ¹Peter H. Nibbering

¹Department of Infectious Diseases, Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden, The Netherlands, ²Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotechnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa, Pisa, Italy.

C. albicans è un lievito patogeno opportunistico che sostiene infezioni locali o sistemiche nell'ospite immunocompromesso. Le candidosi sono spesso trattate con triazoli e, in particolare, con fluconazolo. L'emergenza di ceppi di *C. albicans* fluconazolo resistenti, che possono essere cross-resistenti ad amfotericina B, evidenzia la necessità di studiare nuovi agenti antifungini, quali i peptidi antimicrobici. hLF(1-11), un peptide sintetico che comprende il primo sito cationico della lattoferrina umana, mostra un'efficace attività di *killing* persino verso ceppi di *C. albicans* fluconazolo resistenti. Studi recenti hanno mostrato che l'effetto candidacida del peptide è mediato dall'induzione dell'aumento di permeabilità di membrana. Tale effetto sulla membrana di *Candida* avviene a mezzo di ATP extracellulare (ATPe) prodotto dal mitocondrio energizzato in risposta al peptide. L'aumento di ATPe è essenziale ma non sufficiente per uccidere *C. albicans*. Infatti ATP ossidato (oATP), un inibitore irreversibile dei recettori extracellulari per ATP, diminuisce l'attività candidacida di hLF (1-11), ma ATP o analoghi di ATP non mostrano evidente attività candidacida. Il presente studio evidenzia il ruolo delle specie di ossigeno reattivo e del livello intracellulare dei tioli nell'attività candidacida di questo peptide.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI CEPI TOSSIGENI DI *BACILLUS CEREUS* RESPONSABILI DI TOSSINFEZIONI ALIMENTARI

S. Salvetti, C. Barsotti, F. Celandroni, A. Baggiani, E. Ghelardi, S. Senesi

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotechnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa.

Bacillus cereus, un bastoncello gram-positivo, sporigeno, aerobio e mobile per la presenza di numerosi flagelli peritrichi, è riconosciuto da più di 40 anni come agente eziologico di tossinfezioni alimentari caratterizzate da due sindromi distinte, la emetica e la diarroica, dovute alla produzione di tossine diverse. Nonostante siano stati effettuati numerosi studi per valutare la produzione di tossine da parte di ceppi di *B. cereus* e siano stati messi a punto metodi molecolari per la tipizzazione genotipica degli isolati, poco è noto circa l'epidemiologia dei ceppi infettanti, dato che non sono mai state analizzate le proprietà genotipiche e tossigeniche dei ceppi di *B. cereus* isolati nel corso di episodi di tossinfezione alimentare.

Il presente studio ha preso origine da due epidemie di tossinfezione alimentare che si sono verificate a seguito del consumo di alimenti prodotti e forniti, per due indipendenti banchetti, da una medesima pasticceria. *B. cereus* è stato isolato da campioni di feci di 19 soggetti che presentavano una sindrome diarroica, da 4 campioni di dolci prodotti dalla pasticceria e dalla macchina spianatrice utilizzata per la preparazione degli alimenti. Il potenziale tossigeno dei ceppi isolati è stato valutato sia mediante analisi della produzione di emolisina BL, PC-PLC e tossina emetica, che tramite amplificazione dei geni codificanti le enterotossine NHE, T, e FM/S, la citotossina K, la sfingomielinasi e la PI-PLC. L'analisi del profilo tossigenico, insieme con la caratterizzazione genotipica degli isolati di *B. cereus*, effettuata mediante RAPD-PCR e multiplex RAPD-PCR, ha chiaramente rivelato che tutti i ceppi di *B. cereus* collezionati sono assimilabili ad un unico stipe microbico dotato di elevato potere tossigeno.

I risultati di tale studio dimostrano che la combinazione di metodiche di analisi fenotipica e molecolare costituisce un potente mezzo per identificare la fonte di infezione e per il monitoraggio ambientale e clinico di ceppi tossigeni di *B. cereus*.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI UN MUTANTE DI *BACILLUS CEREUS* AUXOTROFO PER LA VITAMINA B₂

S. Salvetti, F. Celandroni, E. Ghelardi, S. Senesi

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa

Lo sviluppo di una colonia batterica è un processo complesso che viene influenzato da stimoli di varia natura, che vanno dalle semplici esigenze nutrizionali del microrganismo alle più complesse comunicazioni cellula-cellula intracolonia.

Nell'ambito di uno studio più ampio, mirato alla comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione della morfogenesi di una colonia batterica, è stato selezionato un mutante di *Bacillus cereus*, ottenuto dal ceppo NCIB 8122 mediante mutagenesi inserzionale con il trasposone mini-Tn10. Quando seminato su piastre contenenti triptone agar, tale mutante (MS57), era capace di produrre colonie di morfologia diversa rispetto a quelle prodotte dal ceppo selvaggio. L'osservazione microscopica delle colonie prodotte dal ceppo mutante a tempi diversi di incubazione, evidenziava la formazione di un monostrato cellulare caratterizzato da ampie zone di lisi batterica nella porzione centrale della colonia stessa. Al fine di identificare le basi genetiche responsabili del fenotipo del ceppo MS57, è stata sequenziata la regione di inserzione del mini-Tn10. La sequenza ottenuta ha evidenziato l'interruzione, da parte del trasposone, di un gene altamente omologo al gene *ribG* di *Bacillus subtilis*. I prodotti genici dell'operone *rib* (RibG, B, A, H e T) di *B. subtilis* catalizzano la conversione del GTP e ribuloso-5-fosfato a riboflavina, meglio conosciuta come di vitamina B₂. In particolare, il gene *ribG*, interrotto nel ceppo mutante, codifica per un enzima bifunzionale (deaminasi/reduccasi) che agisce nelle prime fasi della sintesi della vitamina a partire dal GTP. Il mutante *ribG*::Tn10 da noi isolato sarà ulteriormente caratterizzato per valutarne una possibile utilizzazione per il dosaggio microbiologico della vitamina B₂.

MOTILITÀ SWARMING E VIRULENZA IN *BACILLUS CEREUS* E *BACILLUS THURINGIENSIS*

E. Ghelardi, F. Celandroni, S. Salvetti, S. Senesi

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa.

Alcuni eubatteri flagellati sono in grado di muoversi su superfici solide mediante un processo di traslocazione multicellulare denominato swarming. Tale motilità, indotta dal contatto con superfici aventi una appropriata viscosità e composizione, è caratterizzata dal differenziamento di cellule vegetative in cellule swarm, lunghe ed iperflagellate. Nonostante questo processo di differenziamento cellulare sia stato ampiamente studiato, in particolare nei batteri Gram-negativi, poco è noto, a tutt'oggi, circa la sua regolazione molecolare. La motilità swarming, che favorisce una rapida diffusione batterica nell'ambiente naturale, contribuisce anche alla colonizzazione delle superfici mucose da parte di batteri patogeni. Inoltre, le cellule swarm di alcune specie sono state riconosciute come forme batteriche più virulente, in quanto capaci di produrre una maggiore quantità di fattori di virulenza (enzimi proteolitici, fosfolipasi, ureasi ed emolisine) rispetto alle cellule non differenziate.

Nel presente studio, è stata analizzata la capacità di differenziamento swarming e la produzione di fattori di virulenza in una ampia collezione di ceppi di *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*. I risultati ottenuti hanno dimostrato che, per queste due specie batteriche, esiste una correlazione significativa tra capacità di dare origine a cellule swarm e secrezione di emolisina BL (HBL), una tossina trimerica (proteine B, L1 ed L2) avente attività enterotossica e necrotizzante.

Al fine di valutare se esistesse una regolazione comune tra sintesi di HBL e differenziamento swarming, sono stati analizzati, inoltre, due ceppi mutanti di *B. cereus* e *B. thuringiensis* che, contrariamente ai ceppi selvaggi, risultavano incapaci di produrre cellule swarm. Sia il mutante di *B. cereus*, caratterizzato da una delezione nel gene *fliY* codificante una proteina del complesso di switch flagellare, che il ceppo di *B. thuringiensis*, mutante inserzionale nel gene *flhA* necessario per l'assemblaggio dei flagelli, sono risultati anche incapaci di secernere HBL. Questi risultati indicano, pertanto, l'esistenza di una regolazione comune del differenziamento swarming e della secrezione di fattori di virulenza in *B. cereus* e *B. thuringiensis*.

EFFETTO DELLA CONTAMINAZIONE DA OLI GREZZI SULLA SOPRAVVIVENZA DI UN CEPPPO, *PSEUDOMONAS SP.* IN UN SUOLO AGRARIO

E. Di Mattia e I. Cacciari.

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università degli Studi della Tuscia, 01100 VITERBO Italia

Il problema del rischio ambientale associato al rilascio accidentale di contaminanti idrocarburici *n*-alcanici è noto da tempo (1), e, negli ultimi anni, sta ricevendo una sempre crescente attenzione. Ad esempio lo smaltimento di quantità enormi di “fanghi ad olio” prodotti durante i processi convenzionali di estrazione petrolifera, rappresenta un grave problema non risolto e tra le proposte di immediato intervento è stato suggerito un possibile spargimento di questi residui nel terreno. Il destino degli idrocarburi nel suolo è per lo più determinato da equilibri ecologici regolati da fattori abiotici e biotici che influiscono sulla crescita, sulla dinamica e la sopravvivenza delle popolazioni specializzate nell'utilizzo degli idrocarburi entro la comunità microbica.

Alcune tecniche di biorisanamento prevedono anche il rilascio nel suolo di inoculanti batterici in grado di degradare i composti xenobiotici (2).

Lo studio della sopravvivenza, della persistenza e della capacità di insediamento di questi inoculanti batterici dopo il rilascio in un determinato tipo di suolo si rende spesso necessario al fine di garantire il successo dell'intervento di “batterizzazione” e di decontaminazione. Molto spesso, infatti, è stato osservato un rapido declino nelle dimensioni della popolazione dei ceppi batterici utilizzatori di idrocarburi a seguito dell'introduzione in suoli naturali (3).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di esaminare in un suolo agrario la sopravvivenza e la persistenza di un ceppo *Pseudomonas sp.* DMS13324, modello di studio e di interesse biotecnologico per processi di biorisanamento di ambienti contaminati da *n*-alcani. I risultati ottenuti suggeriscono che in questo caso la contaminazione da olio grezzo (1% p/V) è determinante per la sopravvivenza a lungo termine e l'insediamento del ceppo nella comunità microbica nel suolo agrario esaminato.

Bibliografia

(1) Atlas R.M., Horowitz A., Krichevsky M. Asim K.B. 1991. *Microbial Ecology* 22, 249-256.

(2) Korda, A., Santas, P., Tenente, A., Santas, R. 1997. *Applied Microbiology Biotechnology* 48, 677-686.

(3) van Veen J.A., van Overbeek L.S., van Elsas J.D., 1997. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 121-135

RESISTENZA AI MACROLIDI IN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* IN ITALIA: CARATTERIZZAZIONE DEGLI ELEMENTI CHE PORTANO I GENI *MEF(A)* E *MEF(E)*

A. PANTOSTI,¹ M. DEL GROSSO,¹ A. SCOTTO D'ABUSCO,¹ F. IANNELLI,² C. MESSINA,³ N. PETROSILLO,⁴ M. SANTAGATI,³ S. STEFANI,³ G. POZZI².

¹ Laboratorio di Bacteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore Sanità, Roma, ² LA.M.M.B., Dipartimento di Biologia Molecolare Univ.di Siena, Siena, ³ Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Univ. di Catania, Catania, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, Roma⁴.

La resistenza all'eritromicina nello *Streptococcus pneumoniae* può essere dovuta a due diversi determinanti genetici: il gene *erm* che codifica per una RNA-metilasi e conferisce resistenza a macrolidi, lincosamidi e streptogramine B e il gene *mef* che codifica per una proteina di efflusso e conferisce resistenza solo ai macrolidi. Sono stati descritti due geni *mef*, *mef(A)* e *mef(E)*, che mostrano un'alta identità di sequenza nucleotidica e sono contenuti in due diversi elementi. Abbiamo studiato 267 ceppi di *S. pneumoniae* di cui 182 isolati da patologie invasive e 85 da portatori sani. È stata esaminata la sensibilità agli antibiotici mediante Etest. Successivamente i ceppi risultati resistenti all'eritromicina sono stati analizzati mediante PCR duplex per i geni *erm* e *mef*. I ceppi positivi per il gene *mef* sono stati ulteriormente studiati mediante PCR-RFLP e sequenziamento, esaminati per il sierotipo e per la clonalità mediante PFGE. Dei 267 ceppi esaminati, 97 (36%) sono risultati resistenti all'eritromicina: 78 portavano il gene *erm(B)* e 20 il gene *mef* di cui 17 *mef(A)* e 3 *mef(E)*. Tutti i ceppi portatori del gene *mef(A)* erano di sierotipo 14, erano sensibili a tutti gli antibiotici saggiati, eccetto l'eritromicina, mostravano patterns PFGE simili, suggerendo l'appartenenza ad uno stesso clone. I tre ceppi *mef(E)* appartenevano a due diversi sierotipi, non erano clonalmente correlati e mostravano resistenza ad altri antibiotici, compresa la penicillina. Sono stati analizzati rispettivamente i due elementi genici che contengono *mef(A)* o *mef(E)*. In ciascun gruppo le sequenze del gene *mef* e di un gene adiacente sono risultate identiche. L'elemento *mef(A)* è risultato inserito nello stesso sito cromosomale (gene *ceiB*) in tutti i ceppi, comportando una perdita della proprietà della competenza. Diversamente l'elemento *mef(E)* risultava localizzato in siti cromosomici diversi e non influenzava la competenza dei ceppi. In conclusione gli elementi *mef(A)* e *mef(E)* hanno caratteristiche diverse e pertanto sarebbe opportuno tenere distinti i due geni in studi futuri.

ANALISI DI FRAMMENTI FAB RICOMBINANTI UMANI DIRETTI VERSO GLICOPROTEINE DI SUPERFICIE DI HERPES SIMPLEX (HSV)

Bugli F, R. Graffeo, S. Ranno, R. Ricci, R. Santangelo, R. Torelli, S. Manzara, P. Cattani, M. D'Isanto*, M. Galdiero** e G. Fadda
Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

*Dipartimento di Patologia Generale e **Dipartimento di Medicina Sperimentale Facoltà di Medicina e Chirurgia, II Università di Napoli

Gli Herpesvirus umani sono responsabili di numerose patologie, le più diffuse delle quali sono quelle causate dall'Herpes simplex (HSV). In questo lavoro sono stati selezionati 44 Fab monoclonali umani ottenuti da genoteche combinatoriali ad esposizione fagica (phage display library) reattivi nei confronti di HSV tipo 1 e tipo 2, mediante test immunoenzimatici (ELISA) e test di immunofluorescenza (IFA). Per meglio caratterizzare i frammenti Fab reattivi, sono state allestite delle reazioni di immunofluorescenza utilizzando cellule eucariotiche (Cos7) in cui erano espresse singole glicoproteine di superficie (gD, gB, gH/gL) di HSV1, dopo transfezione con plasmidi contenenti le rispettive sequenze geniche di tali proteine erpetiche. Sono stati individuati 12 Fab reattivi nei confronti di gB, 5 di gD e 2 di gH/gL. Inoltre, è stato selezionato un pannello di Fab monoclonali diretti contro la glicoproteina G di superficie di HSV2. In particolare, il clonaggio di questo anticorpo è stato reso possibile da una strategia di selezione che ha sfruttato il preassorbimento della library anticorpale umana su antigeni del virus HSV1, in modo da eliminare gli anticorpi diretti contro di essi, seguito da un ulteriore passaggio di selezione ed amplificazione (panning) utilizzando la glicoproteina G dell'HSV2 fissata su supporto solido.

Dopo purificazione per immunoaffinità, è stata saggiata la capacità dei Fab selezionati di neutralizzare *in vitro* l'infettività virale, utilizzando sospensioni titolate di HSV1 e 2 rispettivamente, mediante inibizione dell'effetto citopatico (TCD₅₀) in colture di cellule Vero e conta delle placche di lisi. Tra i Fab saggiati sono risultati attivi nell'inibire l'effetto citopatico *in vitro* alcuni di quelli reattivi nei confronti della glicoproteina di superficie gB. Risultati incoraggianti sono inoltre emersi dalle prove di neutralizzazione allestite con miscele di Fab costituite da tre differenti frammenti anticorpali reattivi verso glicoproteine diverse, facendo supporre un sinergismo nell'attività neutralizzante l'infettività virale. Tali Fab, potrebbe rivelarsi un strumento utile sia per il loro potere neutralizzante che per lo studio del processo d'infezione da HSV mediante l'analisi della reattività delle glicoproteine virali di superficie.

STRATEGIE MOLECOLARI PER LA TIPIZZAZIONE DI ENTEROVIRUS UMANI.

Manzara S., M. Muscillo*, G. La Rosa*, C. Marianelli*, P. Cattani e G. Fadda

Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

*Istituto Superiore di Sanità, Roma

Gli enterovirus costituiscono un ampio genere di virus umani responsabili di infezioni asintomatiche o di notevole valore clinico. Identificazioni tramite il test di neutralizzazione (LBM) ed immunofluorescenza (IFA) hanno un'applicabilità limitata dalle varianti antigeniche di ceppi noti, dai nuovi ceppi emergenti, oltre che dal fatto che non tutti i ceppi sono in grado di crescere su linee cellulari o di dare luogo ad effetto citopatico.

Nel nostro laboratorio sono stati analizzati 78 ceppi di virus isolati da campioni clinici (tamponi faringei, feci, liquor) ed identificati mediante metodiche tradizionali, RT-PCR nella regione 5'NC e analisi dei frammenti di restrizione (RFLP) dei prodotti di amplificazione. Dall'analisi dei risultati ottenuti, è stato possibile identificare 27 ceppi di poliovirus e 51 di enterovirus non-polio. Mentre per i poliovirus le metodiche sopra menzionate hanno mostrato una concordanza pari al 100%, per i virus non-polio si è reso necessario procedere, per l'identificazione, ad ulteriori indagini. I relativi RNA virali sono stati analizzati mediante RT-PCR utilizzando due coppie di "primer", degenerati con deossiosina, costruiti sulle regioni VP1 e VP4/VP2, e successiva analisi delle sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche. Nei casi di risultati non dirimenti è stata utilizzata un'ulteriore coppia di "primer" sulla 5'NCR ed analizzata la sequenza nucleotidica dell'amplificato.

I risultati ottenuti da questa analisi hanno permesso, tra l'altro, l'identificazione di due Echovirus 71, la presenza dei quali non risulta essere stata registrata in Italia; di numerosi ceppi di Echovirus 30, per i quali si è avuta una concordanza di identificazione con LBM ed IFA pari al 91,6%. Per due Echovirus 22, identificati mediante LBM, non si è avuta nessuna conferma molecolare. Infine, per quanto riguarda i ceppi identificabili solo con l'amplificazione in VP4/VP2, è rilevante il fatto che l'analisi delle sequenze amminoacidiche di questa regione ha mostrato sia un'alta percentuale di omologia con quelle dei ceppi di riferimento che un'elevata concordanza con l'identificazione mediante LBM ed IFA.

ANALISI GENETICA E FILOGENETICA IN AMBITO MEDICO-LEGALE PER LO STUDIO DEL GRADO DI CORRELAZIONE TRA CEPPI DI VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA UMANA

Pistello Mauro¹, Del Santo Barbara¹, Buttò Stefano², Domenici Ranieri³, Bendinelli Mauro¹

¹ Sezione Virologia e Centro Retrovirus, ² Sezione Medicina Forense, Dipartimento di Biomedicina, Università di Pisa; ³ Laboratorio Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Allo scopo di comprovare la trasmissione diretta di HIV-1 in due episodi, è stata studiata la somiglianza genetica tra i ceppi virali in soggetti sospettati di aver trasmesso l'infezione ed in quelli infettati mediante analisi di sequenza della regione V3 di *env*.

Dall'accertamento dello stato di HIV-positività, determinato mediante ricerca del provirus nei leucociti con *gag* PCR, si è proceduto ad amplificazione e sequenziamento di una porzione di *env* (340 basi) comprendente la regione V3 ed altamente informativa per studi di trasmissione dell'infezione ed indagini epidemiologico-molecolari. Le sequenze ottenute dai ceppi in esame e dai controlli utilizzati (ceppi HIV di laboratorio ed isolati da pazienti infetti) sono state allineate con sequenze di alcuni ceppi di riferimento disponibili in banca dati e, per ridurre al minimo *bias* per errato campionamento, di dodici ceppi italiani. L'allineamento delle sequenze ha dimostrato che i ceppi dei soggetti in esame erano distinti tra loro e diversi dai controlli utilizzati escludendo quindi contaminazioni accidentali.

L'analisi della distanza genetica è stata condotta sulle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche allineate ed utilizzando diversi algoritmi matematici. Come atteso, le distanze genetiche tra i ceppi italiani sono risultate generalmente inferiori rispetto a quelle osservate con i ceppi extraitaliani, a dimostrazione di una maggiore correlazione genetica. Le distanze genetiche più basse sono state osservate tra i ceppi dei soggetti in esame.

Dalle distanze genetiche nucleotidiche ed aminoacidiche sono state poi ricostruite le relazioni filogenetiche esistenti tra i ceppi analizzati. Gli alberi filogenetici hanno mostrato la diversa segregazione degli isolati italiani rispetto a quelli extraitaliani ed il raggruppamento degli isolati dei due casi in esame in due *cluster* ben distinti dagli altri ceppi italiani, dimostrando quindi l'esistenza di strette relazioni filogenetiche all'interno dei casi stessi. La maggior somiglianza osservata tra i ceppi dei soggetti sospettati per aver trasmesso l'infezione e dei soggetti infettati è compatibile quindi con l'ipotesi di trasmissione diretta del virus.

CORYNEBACTERIUM MACGINLEYI: UN NUOVO PATOGENO OCULARE? PRIMO ISOLAMENTO IN ITALIA.

Autori: Giovanni M. Giammanco¹, Vincenzo Di Marco², Francine Grimont³, Patrick A.D. Grimont³

Affiliazione: ¹ Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro", Università di Palermo; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo; ³ Unité Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes, Institut Pasteur, Paris.

La specie *Corynebacterium macginleyi* è stata descritta nel 1995 da Riegel et al. nel corso di un ampio studio sui corinebatteri lipofili. Dopo la prima descrizione della nuova specie, solo 25 isolamenti clinici di *C. macginleyi* sono stati segnalati in letteratura, esclusivamente in Svizzera e Germania e su campioni oculari. Il primo isolamento in Italia di *C. macginleyi* è stato da noi ottenuto da un tampone congiuntivale proveniente da un paziente affetto da congiuntivite acuta bilaterale. *C. macginleyi* è cresciuto in coltura pura dal tampone congiuntivale. Piccole colonie di corti bacilli pleomorfi Gram+ sono state osservate dopo 48 h di incubazione a 37°C su Columbia agar addizionato di sangue di montone al 5%. La galleria API Coryne (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ha permesso di identificare senza ambiguità il nostro isolato come *C. macginleyi*. La lipofilia del ceppo isolato è stata confermata mediante il saggio di crescita su agar-sangue addizionato di Tween 80. Il sequenziamento del gene per l'RNA ribosomico 16S ha confermato la sua appartenenza alla specie *C. macginleyi*. Esso si è dimostrato sensibile *in vitro* ad un vasto pannello di antibiotici in accordo con quanto descritto in letteratura per *C. macginleyi*. La terapia antibiotica locale iniziata su base empirica subito dopo il prelievo ha permesso di risolvere velocemente la sintomatologia. Sfortunatamente, non è stato effettuato un tentativo di isolamento virale dallo stesso campione, cosicché non è possibile escludere che *C. macginleyi* fosse solo responsabile di una sovrainfezione in corso di congiuntivite virale. L'isolamento di questo germe in coltura pura e la immediata regressione della sintomatologia in seguito alla terapia antibiotica suggeriscono però un suo ruolo nella patologia. L'isolamento di questo microrganismo anche in Italia indica che la sua circolazione non è limitata geograficamente. Nonostante la patogenicità di *C. macginleyi* non sia ancora dimostrata, questo microrganismo dovrebbe essere preso in considerazione almeno come causa potenziale di sovrainfezione batterica nelle congiuntiviti virali e nella diagnosi differenziale nelle infezioni batteriche oculari e congiuntivali.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI CINQUE NUOVI GENI COINVOLTI NEL PROCESSO DI DIVISIONE CELLULARE IN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*.

D. Fadda¹, C. Pischredda¹, F. Caldara², D. Anderluzzi² e O. Massidda¹

¹Dip. Sc. Chirurgiche, sez. Microbiologia, Università di Cagliari, ²GSK Group, Med. Res. Center, Verona.

Nel corso dello studio del cluster della divisione cellulare (*dcw*) dello *Streptococcus pneumoniae* abbiamo identificato un gene che codifica l'omologo del gene *divIVA* del *Bacillus subtilis*, coinvolto nella determinazione della specificità topologica del setto di divisione cellulare. Nello *S. pneumoniae* il *divIVA* è l'ultimo di un gruppo di geni localizzati in una regione cromosomica immediatamente a valle del gene di divisione *ftsZ*, il cui prodotto forma un anello contrattile necessario per la citochinesi. Oltre al gene *divIVA* questa regione contiene cinque ORFs, codificanti proteine la cui funzione è ancora sconosciuta e da noi denominate *ylmD*, *ylmE*, *ylmF*, *ylmG* e *ylmH* sulla base della loro omologia con geni omonimi annotati nella sequenza dell'intero genoma del *B. subtilis*. L'analisi strutturale, eseguita comparando le sequenze di *S. pneumoniae* con quelle di altri batteri, ha dimostrato che questa regione cromosomica è altamente conservata in tutti i batteri Gram-positivi, incluse le specie non strettamente correlate da un punto di vista evolutivo. L'analisi funzionale, ottenuta mediante l'inattivazione dei singoli geni e successiva analisi dei fenotipi mutanti mediante microscopia a contrasto di fase, colorazione del nucleotide e microscopia elettronica, ha evidenziato un ruolo di questi geni, precedentemente sconosciuti, nel processo di divisione cellulare. In particolare, i mutanti di *S. pneumoniae* che contenevano il gene *divIVA* inattivato (*divIVA::cat*) mostravano inibizione della crescita, morfologia alterata e presenza di lunghe catene di cellule non separate, spesso prive di nucleotide. I mutanti degli altri geni inattivati, rispettivamente *ylmE::cat*, *ylmF::cat*, *ylmG::cat* e *ylmH::cat*, mostravano fenotipi diversi in relazione al gene inattivato. L'intera regione risultava essenziale per la crescita batterica, come indicato dall'assenza di crescita di mutanti in cui l'intero cluster era stato inattivato geneticamente. L'analisi trascrizionale, eseguita sia mediante lo studio computerizzato delle sequenze dei geni che mediante identificazione dell'RNA messaggero con RT-PCR, ha evidenziato che, in *Streptococcus pneumoniae*, questi geni sono cotrascritti con i geni di divisione cellulare *ftsA* e *ftsZ*. I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che questi geni, finora sconosciuti, giochino un ruolo importante nel processo di divisione cellulare, e in particolare nella formazione del setto.

STUDIO DELL'INTERAZIONE DELLE VARIANTI DI *M. TUBERCULOSIS* H37 CON LE CELLULE DI MICROGLIA FETALE UMANA.

R. Carta*, G. Palmieri*, V. Sogos**, M. Curto **, F. Gremo**, M.A. Marcialis*

* Dip. Sc. Chirurgiche Sez. Microbiologia, Facoltà di Medicina Università degli Studi di Cagliari.

** Dip. Citomorfologia, Facoltà di Medicina Università degli Studi di Cagliari.

E' nostro interesse studiare in vitro l'interazione ospite-parassita nella meningite tubercolare. Nei precedenti lavori abbiamo osservato che nell'infezione della microglia fetale umana la variante liscia trasparente del *M. avium* si è dimostrata più virulenta rispetto alla variante liscia opaca; questi risultati ci hanno indotto a proseguire i nostri studi utilizzando il *M. tuberculosis* H37, rivolgendo la nostra attenzione soprattutto a quelle che sono le sue caratteristiche morfologiche. Il *M. tuberculosis* H37 isolato per la prima volta nel 1905, fu successivamente dissociato in due varianti, rugosa virulenta (Rv) e rugosa avirulenta (Ra). Nei nostri esperimenti abbiamo infettato 10^6 cell/piastra di microglia fetale umana con concentrazioni di 10^6 - 10^7 CFU/ml di Rv e Ra coltivati in terreno liquido; valutato l'internalizzazione delle due varianti ai tempi compresi tra 30' sino alle 48 ore; osservato la morfologia dei micobatteri mediante colorazione in fluorescenza con Auramina O e con il metodo di Ziehl-Neelsen; e quindi valutato la conta dei micobatteri (CFU) ottenuti dalla semina dei lisati cellulari. L'osservazione microscopica ha rilevato che i micobatteri della variante Rv appaiono come bastoncini corti e tozzi dai 30 minuti alle 2 ore di infezione, per diventare allungati e sottili alle 48 ore dall'infezione, presentandosi più piccoli e segmentati; mentre i micobatteri della variante Ra appaiono, dai 30 minuti alle 2 ore di infezione, come bastoncini lunghi e tozzi, per diventare alle 48 ore dall'infezione allungati e sottili, piccoli e segmentati. Queste variazioni stanno ad indicare come l'ambiente intracellulare possa determinare effetti sulla morfologia batterica. Infine dalle curve di infezione abbiamo ottenuto valori di CFU/ml pari a 5.5×10^4 per l'Rv, e 3.1×10^6 per l'Ra ai 30 minuti, valori che aumentano alle 48 ore fino ad arrivare a 8×10^6 CFU/ml per l'Rv, e 3×10^6 CFU/ml per l'Ra. I nostri dati indicano che i micobatteri fagocitati sopravvivono e crescono all'interno delle cellule di microglia, in modo differente in relazione alla loro virulenza, quindi la microglia non solo rappresenta il loro bersaglio, ma anche la loro riserva.

IDENTIFICAZIONE DI LISTERIA MONOCYTOGENES NEGLI ALIMENTI: ANALISI CRITICA DI METODI DI INDAGINE CULTURALI, MOLECOLARI E MISTI

A.Ingianni , M.A.Madeddu, M.Quartuccio e R.Pompei.

Dipartimento di Scienze Mediche, Sezione di Microbiologia, Università di Cagliari.

INTRODUZIONE - L'identificazione rapida di microrganismi patogeni negli alimenti riveste una notevole importanza pratica nei sistemi di controllo delle produzioni industriali. L'identificazione "in tempo reale" diventa indispensabile per evitare il rallentamento o l'interruzione dei cicli produttivi. A tal fine i metodi classici basati sulla coltura dei campioni si sono dimostrati del tutto insufficienti e attualmente sono sempre più diffusamente sostituiti da sistemi di rilevazione molecolare basati su PCR e sonde a DNA. In questo lavoro viene fatta un'analisi critica di diversi metodi di isolamento ed identificazione della *Listeria monocytogenes* in vari tipi di alimenti, basati su analisi molecolari o su sistemi misti culturali-molecolari.

METODI - Sono stati confrontati diversi metodi culturali, con uso di terreni selettivi liquidi e solidi differenti, sistemi molecolari basati su PCR e su sonde a DNA specifiche per fattori di patogenicità della listeria (internalina A) e sistemi misti che univano l'uso di terreni di arricchimento con PCR e sonde.

RISULTATI E COMMENTO - Dato il numero esiguo di listerie abitualmente presenti negli omogenati alimentari, una fase di prearricchimento si è rivelata sempre necessaria. In questo caso la scelta dei terreni si è rivelata determinante; in particolare i risultati migliori sono stati ottenuti col terreno liquido di Fraser e col terreno solido Aloa a 37°C per 18-24 ore. Altri terreni di arricchimento hanno causato fino al 50% di falsi negativi negli omogenati di cibi vari. La sola tecnica di PCR eseguita con differenti sets di oligonucleotidi specifici per i geni della listeriolisina, dell'internalina e della iap della *L. monocytogenes*, pur essendo molto rapida e specifica, ha mostrato di avere una limitata sensibilità dovuta alla carica batterica iniziale del campione, che nella maggior parte dei casi era piuttosto bassa. D'altra parte, un arricchimento eccessivamente prolungato poteva indurre un aumento indiscriminato della flora batterica, che influiva negativamente sulla affidabilità della PCR. La maggiore sensibilità, specificità e affidabilità è stata ottenuta mediante un protocollo che includeva un breve arricchimento del campione in terreno selettivo specifico a 37°, seguito dall'amplificazione mediante PCR e validazione finale con la sonda a DNA Prodict-list59.

Ricerca eseguita con contributo della Fondazione Banco di Sardegna e con la collaborazione di Biotecne, Cagliari.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA E BURKHOLDERIA CEPACIA NELL'AMBIENTE E NELL'UOMO.

Valenti Piera

Dipartimento di Medicina Sperimentale, II Università di Napoli

"Alcuni batteri vivono una vita schizofrenica", essendo in grado di colonizzare l'ambiente e l'uomo. Tra questi, i generi *Pseudomonas* e *Burkholderia* possiedono un'elevata capacità di adattamento nel passaggio dall'ambiente esterno a quello potenzialmente ostile dell'ospite dove possono anche penetrare all'interno delle cellule epiteliali.

Pseudomonas aeruginosa è un ambientale ubiquitario e un patogeno opportunisto nei pazienti affetti da fibrosi cistica (CF) e negli immunocompromessi. La biosintesi dell'alginato e la conseguente formazione di biofilm, da parte di questo batterio, rappresentano l'unico cambiamento fenotipico associato al passaggio dalla vita saprofitica opportunisto nell'habitat naturale a quella parassitaria nell'uomo dove colonizza soprattutto gli epitelii polmonari di pazienti CF. Similmente ad altri batteri Gram-negativi, *P. aeruginosa* possiede un sistema regolativo noto come quorum sensing (QS) che influenza oltre all'espressione di numerosi geni di virulenza, anche il tipo e l'architettura del biofilm. Poiché il sistema QS svolge la sua funzione quando le cellule raggiungono un'elevata densità, condizione questa riscontrata nel biofilm, si può ipotizzare che le differenti situazioni nutrizionali tra l'habitat e l'ospite possano essere molto importanti nella comprensione della biologia di QS e del biofilm.

Per ciò che riguarda *Burkholderia cepacia* originariamente descritto come un fitopatogeno, dal 1980 è emerso come un patogeno opportunisto negli immunocompromessi, nei pazienti CF, nelle infezioni croniche granulomatose e nelle infezioni ospedaliere. Il morfotipo mucosoide di *B. cepacia*, considerato raro, è ora riscontrabile nel 70% dei ceppi isolati che sintetizzano un esopolisaccaride coinvolto nella colonizzazione e persistenza del batterio nell'ospite. Studi molecolari hanno tentato di dimostrare la diversità filogenetica di ceppi *B.cepacia* isolati dai pazienti o dall'ambiente. Tuttavia, il safari microbiologico che include isolamenti nel paziente e nell'habitat non sempre fornisce dati conclusivi sulla fonte di infezione. Inoltre i cambiamenti fenotipici dei ceppi isolati nei pazienti non sempre sono correlati a dei particolari genotipi, ma piuttosto allo status dell'ospite. Basti citare che nei pazienti affetti da CF, a causa della concentrazione di NaCl, le defensine, peptidi dell'immunità naturale ad attività antimicrobica, sono annullate nella loro azione e pertanto i microorganismi possono raggiungere un'elevata concentrazione che comporta l'attivazione dei meccanismi di virulenza citati.

NUOVI EFFETTI DI HIV SU CELLULE UMANE ADERENTI SANE, MEDIATI DA NEF EXTRACELLULARE

C. Serra*, G. Delogu*, M. Ziccheddu*, M. Sale*, E. Olivetta°, M. Federico°, A. Dolei*

*Sezione Microbiol. Clin. Sperim., Dipart. Scienze Biomediche, Univ. Sassari; °Laborat. Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

HIV-1-nef ricombinante (rNef) può entrare in macrofagi sani, ed esplicare effetti biologici, quali l'attivazione di STAT1, l'iporegolazione del CD4 e l'inibizione della replicazione di HIV-M-tropico. Nell'ambito dello studio del ruolo di fibroblasti e cellule epiteliali umani nella patogenesi dell'AIDS, ci siamo chiesti se rNef da HIV-1 possa agire anche su questi sistemi.

Fibroblasti diploidi umani MRC-5, e cellule epiteliali mammarie MEC-1, e renali CI-5 sono stati trattati per 18h con rNef di HIV-1 marcato con fluoresceina, e la fluorescenza internalizzata è stata poi rilevata in confronto a quella di membrana, valutata come legame di anti-CD44 in fluorescenza da rodamina.

I risultati indicano che rNef può essere internalizzato da fibroblasti diploidi e da cellule epiteliali, come evidenziato dalla rilevazione al microscopio confocale di rNef fluoresceinato all'interno del corpo cellulare, al di sotto della fluorescenza corrispondente al CD44.

Le molecole di rNef internalizzato sono biologicamente attive, come dimostrato dalla capacità di trasduzione del segnale (induzione di STAT1) e di riduzione del rilascio di chemiochine (IL-8). Il pretrattamento dei fibroblasti con interferong riduce notevolmente l'internalizzazione di rNef, che a sua volta interferisce con la stimolazione da interferong del rilascio di IL-6.

Questi dati suggeriscono che nelle cellule dei tessuti solidi, oltre agli effetti diretti di HIV, che vi si può replicare ed adattare, è possibile che vi siano degli ulteriori effetti "a distanza", in aggiunta a quelli causati da tat, mediati da nef rilasciato dalle cellule virus-infette, e ciò apre nuove prospettive sui meccanismi di patogenesi, tutti da valutare.

IL RETROVIRUS HERV-W ASSOCIATO ALLA SCLEROSI MULTIPLA (MSRV) VIENE RILASCIATO DA LINFOCITI DI SOGGETTI PORTATORI ED È SENSIBILE A CITOCHINE E HIV

Serra C*, Mameli G*, Sotgiu S#, Arru G*, Rosati G#, Dolei A*.

*Sez. Microbiol. Clin. Sperim., Dip. Sci. Biomed., e #Ist. Clin. Neurologica, Università di Sassari

Il retrovirus MSRV, associato alla sclerosi multipla (MS), è un membro esogeno della famiglia HERV-W dei retrovirus endogeni umani, prodotto da pazienti affetti da MS (100% dei pazienti della Sardegna*, isola che ha una delle più alte incidenze di MS al mondo) e, in percentuale minore, da altri soggetti, sia *in vivo* che *in vitro*. Le citochine sono coinvolte nella insorgenza della MS e nella progressione della malattia, il cui aggravamento è correlato a citochine proinfiammatorie come IFN γ e TNF- α , mentre IFN β è usato in terapia.

Sono stati selezionati soggetti MSRV-positivi (pazienti con MS in fase stazionaria e donatori sani), e sono stati eseguiti prelievi di sangue, da cui sono state separate le cellule mononucleate (PBMC). Tali cellule sono state poste in coltura come tali o in presenza di trattamenti (mitogeni, citochine, HIV o HIV-tat) per rilevare il rilascio di virus e di citochine nel tempo. I supernatanti di coltura sono stati trattati per estrazione di RNA virionico, trascrizione inversa e PCR "nested" qualitativa o semiquantitativa con primers specifici per il gene MRSV-pol.

Gli esperimenti eseguiti indicano che le PBMC di tutti i soggetti portatori rilasciano MSRV extracellulare in coltura, in modo tempo-dipendente. Il rilascio del virus è regolato dall'attivazione cellulare e dai trattamenti. Citochine pro-infiammatorie, come TNF- α e IL-6 determinano un aumento della resa di MRSV, come si verifica per altri retrovirus. Un dato interessante è costituito dal fatto che in cellule trattate con IFN γ e IFN β si osservano effetti opposti, in quanto il rilascio di MSRV viene stimolato dal primo e inibito dal secondo, in modo dose-dipendente. E' stata osservata interferenza tra retrovirus umani, in quanto l'infezione delle PBMC MSRV-positive con HIV e il trattamento con tat interferiscono con il rilascio di MSRV nei supernatanti.

* Dolei A, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Sechi S, Cirotto MC, Rosati G, Sotgiu S. Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. Neurology, in press

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL POLIOMAVIRUS BKV DA PARTE DI HIV E DI CITOCHINE IN CELLULE MONONUCLEATE UMANE CIRCOLANTI

Ziccheddu M*, Pietropaolo V#, Serra C*, Videtta M#, Biolchini A*, Degener AM°, Dolei A*
*Sez. Microbiol. Clin. Sperm., Dip. Sci. Biomed., Univ. Sassari; °Dip. Med. Sperm. e Patol. e #Dip. Sci. Sanità Pubbl., Univ. La Sapienza, Roma

Il poliomavirus BKV infetta precocemente la specie umana, istaurandovi una infezione persistente asintomatica. Si ritiene che il virus persista nel rene e si riattivi a seguito di alterazioni del sistema immune. Nostri studi precedenti* indicano che i linfociti dei soggetti sani non sono sito di persistenza virale, e che la rilevazione di BKV-VP1 DNA in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) è indice di infezione recente o riattivazione.

Al fine di definire meglio il ruolo delle PBMC nell'infezione da BKV, sono stati selezionati soggetti sani, immunocompetenti, presentanti nelle loro PBMC geni di BKV, in parallelo con soggetti presentanti PBMC BKV-negative. Sono stati eseguiti prelievi di sangue, da cui sono state separate le PBMC, che sono state coltivate come tali o con trattamenti (mitogeni, citochine, HIV vitale o proteina transattivante HIV-tat), per tempi diversi. Sono stati poi estratti DNA e RNA ed analizzati, rispettivamente, mediante PCR e RT-PCR semiquantitative, con primers specifici per l'antigene T del BKV.

Gli esperimenti eseguiti indicano che le PBMC di soggetti portatori, in coltura, esprimono ed accumulano DNA e RNA specifici per l'antigene T e che le PBMC di soggetti negativi si infettano esogenamente in coltura. Le condizioni sperimentali che attivano la proliferazione cellulare determinano di fatto un aumento di produzione virale. Oltre a ciò, la replicazione di BKV, vista come accumulo di DNA Tag e come espressione di RNA Tag-specifici, viene modulata in modo differenziale nel tempo a seguito di trattamento delle colture con citochine pro-infiammatorie, e di interferon beta. La modulazione di BKV si verifica anche quando le cellule sono incubate in presenza di HIV o tat.

I risultati ottenuti sono in accordo con l'osservazione dell'attivazione *in vivo* del BKV e dell'aumento di patologie associate al BKV in pazienti HIV-infetti: ciò potrebbe essere dovuto, almeno in parte, ad HIV, o direttamente, mediante transattivazione da tat, o indirettamente, tramite induzione di citochine, e non solo per la paralisi del sistema immune.

* Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, Lavorino C, Manca M, Degener AM. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion center. J Gen Virol 81:1967-1973, 2000

RESISTENZA CELLULARE AGLI INIBITORI DELLE PROTEASI ATTIVI CONTRO L'HIV.

F. Bellomi¹, O. Turriziani¹, P. Di Marco¹, C. Scagnolari¹, E. Riva², F. Dianzani², G. Antonelli¹.
1. Dip.to Medicina Sperimentale e Patologia-Sezione Virologia, Università "La Sapienza", Roma; 2. Università Campus Bio-medico, Roma.

E' ormai noto che la maggior parte degli inibitori delle proteasi (IPs) sono ottimi substrati della P-glicoproteina (Pgp). Allo scopo di verificare se fattori cellulari potessero essere coinvolti nella non risposta o nell'acquisizione della resistenza durante il trattamento dell'infezione da HIV con IPs abbiamo verificato l'influenza dell'espressione della Pgp sulla attività antivirale dei suddetti composti. La linea cellulare linfoblastoide esprimente elevati livelli di Pgp (CEM^{VBL100}), e la linea parentale (CEM), sono state trattate con diverse concentrazioni di Saquinavir e Indinavir, due IPs comunemente impiegati nella pratica clinica, dopo infezione con il ceppo HIV-pn143. I risultati ottenuti dimostrano che nelle CEM^{VBL100} l'attività antivirale di entrambi i composti è significativamente ridotta rispetto alla linea parentale. In effetti il valore di ID₅₀^{VBL100} di entrambi i composti nelle CEM^{VBL100} risulta significativamente aumentato rispetto ai valori osservati nella linea parentale. Esperimenti eseguiti utilizzando un inibitore specifico per la Pgp hanno dimostrato che è possibile ripristinare l'attività antivirale e, di conseguenza, che la riduzione osservata è specificamente dovuta alla presenza di questa glicoproteina. In altri esperimenti è stato studiato, utilizzando SQV radioattivo, l'effetto della Pgp sull'accumulo intracellulare del SQV nelle CEM^{VBL100} e nelle CEM. L'accumulo di SQV nelle CEM^{VBL100} è significativamente ridotto rispetto alle CEM a dimostrazione della diminuita capacità di trattenere SQV da parte delle cellule che esprimono la Pgp. Inoltre la quantità di farmaco radioattivo intracellulare aumenta nelle CEM^{VBL100} quando viene aggiunto alla coltura cellulare un inibitore specifico della Pgp. Infine per stabilire se l'accumulo di SQV potesse essere influenzato dal concomitante trattamento con un altro IP, le CEM^{VBL100} e le CEM sono state incubate con [¹⁴C]-SQV e Nelfinavir e a diversi tempi è stata misurata la radioattività. E' stato rilevato un incremento della concentrazione intracellulare di SQV nelle CEM^{VBL100} che suggerisce un'interazione competitiva degli IPs per il sito di legame alla Pgp. Il significato clinico di queste osservazioni è ancora oggetto di studio.

ATTIVITÀ CONSERVANTE DELL'OLIO ESSENZIALE DI *CALAMINTHA OFFICINALIS* MOENCH IN ASSOCIAZIONE CON EDTA

Nostro A.¹, Cannatelli M.A.¹, Morelli I.², Cioni P.L.², Bader A.³, Musolino A.D.¹, Procopio F.¹, Marino A.¹, Alonzo V.¹.

¹ Dipartimento Farmaco-Biologico, Sezione Microbiologia. Università di Messina.

² Dipartimento di Chimica Bioorganica e Biofarmacia. Università di Pisa.

³ Faculty of Pharmacy. Al-Zaytoonah University of Jordan, Amman-Jordan.

Gli oli essenziali, noti per le loro peculiari proprietà e fragranze, vengono spesso incorporati in formulazioni farmaceutiche e cosmetiche per la cura della pelle. Di recente, grazie alla loro attività antimicrobica, sono stati proposti come agenti conservanti naturali alternativi, da usare da soli o in associazione con i prodotti tradizionali.

Nell'ambito dei nostri studi sull'attività antimicrobica dei prodotti di origine naturale, abbiamo valutato le proprietà conservanti dell'olio essenziale di *Calamintha officinalis* Moench, una pianta medicinale spontanea appartenente alla famiglia delle Labiatae e diffusa in quasi tutta l'Europa e l'Italia. A tal fine, campioni essiccati di *C. officinalis* (foglie) sono stati sottoposti ad idrodistillazione e ad analisi GC/EIMS per la identificazione dei costituenti. È stata valutata, quindi, l'attività antimicrobica dell'olio essenziale da solo, alla concentrazione di 0.25% e 0.5% v/v nel terreno di coltura, e in associazione con EDTA (2 mM), un agente chelante comunemente usato nelle formulazioni cosmetiche. Le prove sono state effettuate su microrganismi tipicamente utilizzati nelle prove di challenge: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404. Su tali ceppi sono state rilevate le curve di mortalità dopo tempi di contatto pari a 2, 7, 14 e 28 giorni e a due temperature di incubazione, 22 °C e 37 °C per i batteri e 22°C e 30°C per i miceti. L'analisi GC/EIMS dell'olio essenziale ha rilevato la presenza di carvone (il costituente presente in maggiore concentrazione), pulegone, 1-8 cineolo, limonene, b-pinene, mentolo, carveolo tra i principali, oltre a tracce di altri composti. L'olio alla concentrazione dello 0.25% e 0.5% v/v ha mostrato attività inibente su *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*; dopo 2 giorni di contatto e fino ai 28 giorni si è verificata la riduzione del numero di cellule vitali di circa 3 unità logaritmiche. Un decremento simile si è rilevato anche su *A. niger*. L'associazione olio-EDTA ha mostrato un effetto sinergico nei confronti di *Ps. aeruginosa*.

ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLATI NEL PRIMO SEMESTRE DELL'ANNO 2001 NEL SERVIZIO DI VIROLOGIA E MICROBIOLOGIA DELLA FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA DELLA SECONDA UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI.

R. Mancuso, L. Sommese, A. Longanella, D. Migliaccio, S. Martini.

Servizio di Virologia e Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, SUN.

L'epidemiologia locale delle resistenze batteriche è uno dei principali criteri per scegliere un adeguato trattamento antibiotico. Con questo studio ci siamo proposti una sorta di sorveglianza microbiologica per seguire come evolvono le resistenze batteriche nel tempo, soprattutto per quanto riguarda penicillina ma anche per gli altri antibiotici utilizzati. Lo studio è stato condotto su ceppi di *Streptococcus pneumoniae* isolati nel primo semestre del 2001 dai tamponi faringei e dai campioni delle basse vie respiratorie, giunti presso il Servizio di Virologia e Microbiologia.

Il tasso di refrattarietà ai b-lattamici è praticamente zero, mentre la refrattarietà ai macrolidi oscilla intorno al 20% e quella agli aminoglicosidi al 30%.

INTERAZIONE IN VIVO E IN VITRO TRA *H. PYLORI* E CELLULE DI CARCINOMA GASTRICO (AGS): MODULAZIONE DEI GENI DELL'APOPTOSI.

B. Perfetto, R. Greco, N. Canozo, E. Grimaldi, P. Del Prete, M.A. Tufano

Dipartimento di Medicina Sperimentale: Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, SUN.

Helicobacter pylori è un batterio microaerofilo, che aderisce mediante "piedistalli di adesione" alla membrana cellulare dell'epitelio di rivestimento della mucosa. Nella dinamica del processo infettivo intervengono numerosi fattori di virulenza, essenziali per la colonizzazione dello stomaco e per la sopravvivenza in un ambiente ostile. Numerosi studi hanno investigato la patogenicità di *H. pylori* in relazione ai prodotti citotossici, inclusi ureasi e la citotossina vacuolizzante (VacA), questa è una proteina con peso molecolare di circa 87Kda. *H. pylori* colonizza l'epitelio gastrico ed esplica la sua azione patogena sul sistema difensivo dell'ospite responsabile del mantenimento dell'omeostasi della mucosa. *H. pylori* è stato identificato come carcinogeno gastrico, ma i meccanismi di azione ancora non sono ben noti. Non è noto se il batterio stimola la proliferazione cellulare o se l'apoptosi indotta da *H. pylori* porta ad una risposta iperproliferativa. La deregolazione del "pathway" apoptotico, implicata in diverse patologie che interessano il tratto gastrointestinale, giocherebbe un ruolo importante nella carcinogenesi gastrica mediata da *H. pylori*. Scopo del lavoro è stato investigare il meccanismo coinvolto nell'aderenza e nell'invasione del patogeno in cellule gastriche AGS, valutandone la capacità invasiva ed il ruolo svolto dalle integrine. E' stata analizzata, inoltre la capacità ad indurre apoptosi, *in vitro* ed *in vivo* (su n. 17 biopsie di pazienti affetti da cancro gastrico) attraverso l'analisi dell'espressione dei geni coinvolti nel processo apoptotico (bax e p53). Su cellule di carcinoma gastrico AGS coltivate *in vitro*, infettate per due ore con *H. pylori*, è stata valutata la percentuale di batteri adesi e di quelli internalizzati. La valutazione delle integrine è stata effettuata mediante western-blot, l'apoptosi è stata valutata sia dal punto di vista morfologico che attraverso l'avvenuta frammentazione del DNA. L'RNA è stato estratto da cellule trattate e non, per la valutazione dell'espressione dei geni coinvolti nel processo apoptotico, mediante RT-PCR. Tale metodica è stata eseguita anche su n.17 biopsie di pazienti affetti da cancro gastrico associato e non ad infezione da *H. pylori*. I risultati mostrano che *H. pylori* induce apoptosi in cellule AGS e che sia *in vivo* che *in vitro* e determina una deregolazione dei geni coinvolti nel processo apoptotico.

MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI INTEGRINE E CITOCHINE IN CHERATINOCITI UMANI STIMOLATI DA *MALASSEZIA FURFUR*.

I. Paoletti, E. Buommino, D. Criscuolo, A. Baroni, G. Donnarumma, M.A. Tufano

II Università degli Studi di Napoli-Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Sperimentale-Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica

La psoriasi è una malattia cronica della cute ad etiologia non chiara che colpisce circa il 3% della popolazione nei paesi industrializzati. La malattia è caratterizzata da iperproliferazione dei cheratinociti, alterazione del loro differenziamento cellulare, accumulo di cellule infiammatorie, alterazioni del microcircolo con dilatazione ed aumento della tortuosità delle anse capillari. Studi recenti indicano che *M. furfur* è associato alla psoriasi, benché il suo preciso ruolo in questo tipo di patologia non sia ancora molto chiaro. *Malassezia furfur* è un lievito lipofilo che fa parte del microbiota cutaneo umano. Tale microorganismo presenta un difetto nella sintesi degli acidi grassi e ha assoluta necessità di acidi grassi esogeni per il suo metabolismo. E' questo il motivo per cui il microorganismo si trova prevalentemente sulla cute, nelle zone dove c'è maggior produzione di sebo: testa, fronte, solco nasolabiale, tronco.

Scopo del lavoro è stato quello di verificare come questo lievito modula l'espressione di alcune citochine stimolanti la proliferazione, come il TGF β e dei recettori della vitronectina e fibronectina (kv β 1, kv β 3, kv β 5). La variazione di espressione di tali recettori potrebbe determinare alterazione delle proprietà adesive dei cheratinociti nella psoriasi. L'attivazione di queste integrine potrebbe promuovere un'adesione temporanea, inducendo migrazione cellulare ed iperproliferazione.

Cheratinociti immortalizzati (cellule HaCat), forniti da Fusening (German Cancer Research Center, Division of Differentiation and Carcinogenesis *in vitro*, Heidelberg, Germany), sono stati coltivati in DMEM 5% FCS. Per i trattamenti è stato utilizzato un rapporto cellule di lievito/cheratinociti di 30:1. Gli estratti proteici ottenuti da cellule HaCat trattate o non con *M. furfur* sono stati separati mediante 12.5% SDS-PAGE. Il contenuto di TGF- β e delle catene integriniche av, β 1, β 3 e β 5 è stato determinato mediante Western blot.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che in cellule HaCat trattate con *M. furfur* per 48 h vi è un aumento di espressione sia di TGF β 1 che delle catene integriniche av, β 1, β 3 e β 5.

Tali dati indicano che il lievito *M. furfur* potrebbe favorire l'insorgenza della patologia modulando citochine e integrine che controllano rispettivamente proliferazione e migrazione cellulare.

RUOLO DELLE DEFENSINE NELLE INFEZIONI CUTANEE INDOTTE DA MALASSEZIA FURFUR.

G. Donnarumma, D. Criscuolo, M. Orlando, I. Paoletti, F. Corrado, M.A. Tufano

II Università degli Studi di Napoli, Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Sperimentale–Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica

La cute umana, oltre a svolgere un ruolo di barriera meccanica, produce molecole antimicrobiche importanti nell'eliminazione di potenziali patogeni cutanei. Tra i numerosi peptidi antimicrobici, un ruolo di particolare importanza svolgono le defensine che dal punto di vista evolutivo, rappresentano una delle vie di risposta immune innata dell'ospite più conservata. Nell'uomo sono state isolate due famiglie di defensine le α e le β , di queste ultime le maggiormente caratterizzate sono la β -defensina 1 (HBD-1) e la β -defensina 2 (HBD-2). Entrambe sono peptidi a basso peso molecolare (3.5-4.5 kDa), carichi positivamente, ricchi in cisteine e sono principalmente espressi nei tessuti epiteliali. L' HBD-1 è costitutivamente prodotta dai cheratinociti della cute e ciò suggerisce un coinvolgimento di tale peptide nella difesa dalle infezioni cutanee. L' HBD-2, invece, è indotta in cheratinociti stimolati con batteri Gram-negativi, Gram-positivi e *Candida albicans*

Malassezia furfur è un lievito lipofilo frequentemente localizzato a livello della cute umana, associato all'insorgenza di numerose malattie croniche tra cui pitiriasis versicolor, dermatite seborroica e psoriasi. Recentemente abbiamo dimostrato che *M. furfur* aderisce alla superficie dei cheratinociti dopo 24 h di co-cultura e dopo 48 penetra all'interno del citoplasma determinando variazioni citoscheletriche.

Scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare la modulazione delle β -defensine e delle citochine proinfiammatorie e immunomodulatorie utilizzando come modello sperimentale cheratinociti umani di linea (HaCat) infettati o meno con *M. furfur*. La produzione di β -defensine è stata valutata effettuando dei test di attività antimicrobica. Inoltre la β -defensina implicata (HBD-1 e/o HBD-2), è stata individuata mediante RT-PCR, utilizzando primers specifici. La modulazione dell'espressione di citochine proinfiammatorie e immunomodulatorie è stata analizzata mediante RT-PCR e Western blot. Infine per valutare il possibile coinvolgimento delle protein chinasi A e C (PKA e PKC), nel pathway di trasduzione utilizzato dal lievito per la produzione di β -defensine e di citochine, gli esperimenti sono stati effettuati in presenza di inibitori specifici.

I nostri risultati indicano che *M. furfur* induce, successivamente alla penetrazione, l'espressione di HBD-2 e citochine immunomodulatorie utilizzando principalmente la via della PKC.

INDIVIDUAZIONE DI FATTORI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN BATTERI ANAEROBI DI RILEVANZA CLINICA: DIFFUSIONE E PERSISTENZA NELL'OSPITE MEDIATA DA ELEMENTI CONIUGATIVI.

Alessandra Arzese, Giuseppe A. Botta

Cattedra di Microbiologia, Policlinico Universitario, Università di Udine, 33100 Udine.

Il ruolo dei batteri anaerobi in patologia umana è attualmente connesso con la genesi di infezioni endogene, di tipo misto, ad evoluzione cronica/asessuale. D'altro canto, gli stessi microrganismi costituiscono una componente di rilievo del microbiota residente; essi quindi contribuiscono in maniera sostanziale a determinare le caratteristiche dell'ecosistema dell'ospite. Il meccanismo base delle genesi delle infezioni endogene miste vede la selezione di talune specie proprio a partire dal microbiota residente, e quindi il passaggio dal ruolo di commensale a quello di patogeno. Se è assodato che il trattamento e la risoluzione del processo infettivo vengano complicati da meccanismi di antibiotico-resistenza dei patogeni coinvolti, allora va sottolineato che tale problematica sussiste anche per i batteri anaerobi: numerosi sono infatti gli stipti clinici resistenti a molecole di impiego terapeutico, con incidenze non più trascurabili. Le informazioni attualmente disponibili sui meccanismi di antibiotico-resistenza degli anaerobi sono ancora scarse, fatta eccezione per specie del *B. fragilis* gruppo: per questi sono stati rivelati elementi coniugativi cromosomici in grado di trasferire resistenza multipla a diversi antibiotici. L'obiettivo principale dello studio era quindi di verificare la diffusione di geni associati a tali elementi nell'ambito dei principali gruppi di anaerobi Gram negativi. Sono stati saggiati 200 ceppi, suddivisi tra campioni clinici e microbiota residente, appartenenti ai generi *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Mobiluncus*, *Bilophila*. Per questi sono stati caratterizzati: fenotipo di antibiotico-resistenza con metodologie NCCLS standard verso tetracicline, macrolidi, clindamicina, ampicillina, cefoxitina, ed il genotipo mediante PCR con primers di consenso o ibridazione con oligonucleotidi fluoresceinati per fattori di resistenza noti per le stesse classi di farmaci (*tetQ*, *N tetM*; *ermF*, *ermG*; *cfiA*, *cfxA*). Oltre il 70% dei ceppi di *B. fragilis* gruppo ha rivelato la presenza di *tetQ* integrato a livello cromosomico, e con frequenza minore (32%) nel genere *Prevotella* e *Porphyromonas* (10%); in parte degli stessi ceppi (dal 35% al 50%) era riscontrabile associata la presenza di fattori della serie *erm*, e in alcuni ceppi di *Prevotella* e *Porphyromonas* anche i quelli per resistenza a β -lattamici. La correlazione con il fenotipo era assoluta per tetracicline-resistenza e resistenza ai β -lattamici, e parziale per eritromicina- e clindamicina-resistenza. La frequenza di rinvenimento di resistenze non presentava differenze tra ceppi clinici e componenti del microbiota in equilibrio. L'analisi della sequenza di amplicons di *tetQ* ed il confronto con quelle già note in altre specie ha permesso di rivelarne l'origine comune e di rafforzare l'ipotesi di disseminazione inter-specie mediata da elementi transponibili mediante coniugazione. In particolare in *Prevotella* gli studi a livello molecolare suggeriscono l'esistenza di almeno una nuova classe di elementi coniugativi che veicolano antibiotico-resistenza. I batteri anaerobi Gram negativi appaiono dunque corredati di complessi meccanismi che conferiscono resistenza multipla a diversi farmaci; tali sistemi potrebbero inoltre contribuire alla diffusione e persistenza nell'ospite di fattori di antibiotico-resistenza, trasmissibili a stipti patogeni residenti o transienti.

Lo studio è stato eseguito grazie ai contributi C.N.R. 92.00548.04 e 98.0076.04.

CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI CLINICI DI ENTEROCOCCUS VANCOMICINO-RESISTENTI (VRE).

Annamaria Lavenia, E.A. Tonin, C. Lagatolla, D. Dolzani, F. Gionechetti, F. Gombac, E. Banfi e C. Monti-Bragadin.
Dipartimento di Scienze Biomediche. Università degli Studi di TRIESTE.
e-mail: A.Lavenia@dsbmail.units.it

Presso il nostro Ospedale nel corso del 1998 è stato isolato, da un caso di infezione addominale, un ceppo di *Enterococcus faecalis* vancomicina-resistente per la presenza del determinante genetico *vanA*. Da allora è stato isolato soltanto un altro ceppo di VRE, portatore del determinante *vanB* ed altri due ceppi non caratterizzati.

Il ceppo *vanA* è stato confrontato con una coppia di *E. faecium* provenienti da una recente epidemia di VRE all'Ospedale di Vicenza (gentilmente forniti dalla prof. R. Fontana, Università di Verona) e con il ceppo *vanA* 228 fornito dal dr. M. J. Pucci della Rockefeller University.

Mediante amplificazione genica è stato possibile dimostrare che in tutte e quattro i ceppi esaminati il determinante genetico *vanA* si trova all'interno del trasposone Tn1546. Tale trasposone risulta essere di 10.8 kb nel ceppo di VRE isolato nel nostro Ospedale e nel ceppo di riferimento 228, mentre dimostra di essere più lungo di circa 1.5 kb nei due ceppi derivati dall'Ospedale di Vicenza. La tecnica del *Southern blot* ha inoltre messo in evidenza che tale determinante genetico ha in tutti i ceppi esaminati una localizzazione plasmidica. In ogni caso tali plasmidi sono stati trasmessi, mediante coniugazione, al ceppo di riferimento JH2-2, anch'esso fornito dal dr. M. J. Pucci, ma anche vari ceppi vancomicina-sensibili isolati da pazienti del nostro Ospedale, dell'Ospedale di Udine e di derivazione aviaria.

L'analisi di restrizione condotta con le endonucleasi *ClaI*, *EcoRI* e *PvuII* sul frammento amplificato dell'intero trasposone ha evidenziato che il ceppo isolato nel nostro Ospedale e il ceppo di riferimento 228 hanno *pattern* di restrizione indistinguibili, mentre i due ceppi provenienti dall'Ospedale di Vicenza hanno l'uno un inserto di 1.5 kb all'interno del gene *vanZ*, l'altro un inserto leggermente più corto alla giunzione tra *vanY* e *vanZ*. L'inserimento all'interno del gene *vanZ* comporta la perdita della teicoplanina-resistenza.

In conclusione le strette analogie esistenti nel determinante genetico della vancomicina-resistenza portato dal ceppo isolato presso il nostro Ospedale e quello degli altri ceppi non aiutano a capire perché esista una così scarsa tendenza alla diffusione di ceppi VRE nel nostro Ospedale.

REAZIONE POLIMERASICA A CATENA PREVIA RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR) PER LA RICERCA E L'IDENTIFICAZIONE DI VIRUS DELLA ROSOLIA. RAPPORTO DI UN CASO CLINICO.

M.C. Medici, M.C. Arcangeletti, A. Calderaro, P. Valcavi, M. Martinelli, L. Zerbini, F. De Conto, F. Ferraglia, C. Chezzi, G. Dettori

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi, Viale Antonio Gramsci, 14, 43100 Parma

Il virus della rosolia, appartenente alla famiglia *Togaviridae*, è responsabile specialmente nei bambini e nei giovani adulti di un'infezione spesso asintomatica o paucisintomatica che se manifesta è caratterizzata da una malattia esantematica acuta, contagiosa ma benigna.

Tuttavia, se l'infezione è acquisita nei primi mesi di gravidanza da donne non immunizzate può provocare gravi danni al feto, dall'aborto spontaneo alla morte perinatale o alle anomalie associate alla sindrome da rosolia congenita.

Viene descritto il ritrovamento dell'acido nucleico (RNA) di virus della rosolia mediante reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione (RT-PCR, Amplimedical, Italia) in campioni di liquor, sangue (leucociti), urina e secrezioni respiratorie (tamponi nasale e faringeo) appartenenti ad una neonata deceduta pochi giorni dopo la nascita. La piccola paziente nata alla 35^a settimana di gestazione da madre con sospetta infezione da rosolia acquisita in gravidanza presentava gravi malformazioni presumibilmente riconducibili a sindrome da rosolia congenita.

Parallelamente un campione di siero della neonata è risultato positivo al saggio immunoenzimatico (Radim, Italia) per la presenza di anticorpi specifici anti-virus della rosolia sia di classe G sia di classe M.

Sulla base della storia clinica ed in relazione agli esiti delle indagini chimico-cliniche e microbiologiche di laboratorio, sia della neonata che della madre, viene discussa la possibile eziologia da virus della rosolia nel caso clinico presentato.

INFEZIONE DA VIRUS TOSCANA IN UN CASO DI MENINGITE DIAGNOSTICATO A PARMA.

M.C. Medici, M.C. Arcangeletti, A. Calderaro, P. Valcavi, M. Martinelli, L. Zerbini, F. De Conto, F. Ferraglia, C. Chezzi, G. Dettori

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi, Viale Antonio Gramsci, 14, 43100 Parma

Il virus Toscana, appartenente alla famiglia *Bunyaviridae*, genere *Phlebotomus*, presente prevalentemente nell'area mediterranea specialmente nei mesi estivi, è capace di causare infezioni acute del sistema nervoso centrale ed è trasmesso all'uomo da *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus perfiliewi*. Per la diagnosi di laboratorio dell'infezione possono essere impiegati sia metodi diretti (isolamento del virus in colture cellulari ed amplificazione di sequenze genomiche virali da liquor) sia metodi indiretti (immunofluorescenza indiretta, reazione di fissazione del complemento, saggio di neutralizzazione della formazione delle placche, saggio immunoenzimatico ed immunoblotting per la ricerca degli anticorpi sierici specifici).

In questa nota viene descritto un caso di meningite da virus Toscana diagnosticato a Parma nel Luglio 2001 in un soggetto di sesso maschile, di 29 anni, ricoverato per sindrome meningea a breve distanza da un soggiorno in Toscana.

L'esame colturale convenzionale condotto sul liquor ha rivelato su monostrato di cellule Vero inoculate la comparsa di un agente citopatogeno. L'indagine elettromicroscopica eseguita previa ultracentrifugazione sull'estratto cellulare della coltura ha dimostrato la presenza di particelle virali ascrivibili alla famiglia *Bunyaviridae*.

L'identificazione dell'agente citopatogeno è stata condotta da un lato mediante immunofluorescenza indiretta utilizzando il siero del paziente, risultato positivo al saggio immunoenzimatico per la presenza di IgG e IgM anti-virus Toscana ("Enzywell Toscana virus IgG/IgM", Diesse, Italia) e, dall'altro, mediante reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione (RT-PCR) con primer specifici per l'amplificazione di sequenze genomiche di virus Toscana (Amplimedical, Italia).

Parallelamente l'acido nucleico di virus Toscana è stato identificato mediante RT-PCR direttamente dal campione di liquor. Lo stesso campione è risultato negativo alle indagini batteriologiche e alla ricerca del genoma di virus herpes simplex, Varicella/Zoster, Epstein-Barr ed enterovirus

L'eziologia della meningite nel paziente esaminato viene discussa sulla base anche della storia clinica e in relazione agli esiti delle indagini tomografiche e chimico-cliniche di laboratorio.

EFFETTI DELL'ESPRESSIONE DEI GENI REGOLATORI ORF50 E ORF57 DI HHV-8 SULLA REPLICAZIONE DEL VIRUS HIV-1.

Caselli E., Galvan M., Rotola A., Mazzali A., Di Luca D. e Cassai E.

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Microbiologia, Università di Ferrara, Ferrara, Italia.

HHV-8 è un γ -herpesvirus correlato causalmente a tutte le forme cliniche del sarcoma di Kaposi e ad altre patologie neoplastiche, tra cui i linfomi ad effusione cavitaria e la malattia multicentrica di Castleman. La frequenza e la gravità delle patologie correlate ad HHV-8 è sensibilmente maggiore in corso di infezione da HIV-1, e numerosi dati di letteratura suggeriscono che i due virus possono interagire sia in vivo che in vitro. In particolare, HIV-1 è in grado di indurre la attivazione litica di HHV-8, probabilmente grazie alle proprietà transattivanti della proteina Tat. La riattivazione di HHV-8 dalla fase di infezione latente è considerata un evento critico nello sviluppo del tumore, ed è indotta dall'espressione dei geni regolatori ORF50 e ORF57. Risultati da noi ottenuti precedentemente hanno dimostrato che ORF50, oltre ad indurre l'attivazione trascrizionale di HHV-8, è in grado di interagire sinergicamente con Tat nella transattivazione dell'LTR di HIV-1, rendendo biologicamente attive quantità di Tat altrimenti trascurabili. Anche ORF57 determina un incremento delle capacità transattivanti di tat, ma la sua azione appare mediata dall'induzione di altri fattori virali. Sulla base di queste osservazioni ci siamo proposti di verificare il significato biologico degli effetti molecolari osservati, focalizzando l'attenzione sulla replicazione di HIV-1. Abbiamo pertanto analizzato gli effetti dell'espressione di ORF50 e ORF57 sulla suscettibilità cellulare all'infezione *in vitro* con HIV-1. L'analisi è stata condotta sia su cellule naturalmente permissive al virus (linee linfoidi T CD4+), che su cellule non permissive all'infezione, includendo tipi cellulari considerati target di infezione da HHV-8 (linee linfoidi B) o meno (linee gliali). L'andamento dell'infezione da HIV-1 in queste cellule è stato studiato mediante analisi di: i) presenza del DNA provirale (PCR); ii) trascrizione di geni regolatori e strutturali di HIV-1 (rtPCR); iii) produzione di antigene p24; iv) rilascio di virus HIV-1 infettante. I risultati hanno dimostrato che l'espressione di ORF50, e in alcuni casi di ORF57, induce un aumento di suscettibilità all'infezione con HIV nelle cellule suscettibili, e consente una replicazione transiente del virus nelle cellule non permissive all'infezione.

ANALISI DEL FENOTIPO E GENOTIPO DI VIRULENZA DI DIVERSI CEPPI DI *ENTEROCOCCUS FAECIUM* E *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

DUPRÈ I.,¹ ZANETTI S.,¹ MURA M.,¹ SPANU M.L.,¹ LEONE F.,² E SECHI L.A.¹

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università degli studi di Sassari, Viale S. Pietro 43/B, 07100 Sassari, Italy. ² Istituto di Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia "Agostino Gemelli", Università Cattolica del Sacro Cuore, 00168 Roma, Italy

Gli Enterococchi sono largamente diffusi in natura. Nella specie umana sono dei normali commensali della cavità orale, del tratto gastrointestinale e della volta vaginale; ambienti questi, ecologicamente complessi, ricchi dal punto di vista nutrizionale e poveri di ossigeno. Recentemente gli enterococchi sono divenuti la seconda causa di infezioni nosocomiali acquisite (sono responsabili di circa il 16% delle infezioni ospedaliere). Nonostante questo, non si conosce ancora con chiarezza il meccanismo di patogenicità di questi batteri. Recentemente, sono stati caratterizzati diversi geni di virulenza in *Enterococcus faecalis* per la citolisina, la proteasi e per la sostanza di aggregazione. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di ricercare fenotipi e genotipi di virulenza mediante la caratterizzazione genotipica di diversi isolati clinici mediante la ricerca di diversi geni di virulenza quali i geni codificanti per la sostanza di aggregazione AS, per proteine di superficie esp, ACE, EFA e gelatinasi gelE. Inoltre è stata studiata la proprietà adesiva a diverse linee di cellule renali di scimmia (Vero) e intestinali (Caco).

IMPATTO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSTICA DELLE MICOBATTERIOSI.

Sechi L.A.,¹ Spanu M.L.,¹ Mura M.,¹ Duprè I.,¹ Fadda G.,² Zanetti S.¹

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università degli studi di Sassari, Viale S. Pietro 43/B, 07100 Sassari, Italy. ² Istituto di Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia "Agostino Gemelli", Università Cattolica del Sacro Cuore, 00168 Roma, Italy

Circa un quinto della popolazione mondiale alberga *Mycobacterium tuberculosis*. Con l'incremento delle infezioni da HIV, particolarmente nei paesi africani, è aumentata la necessità di utilizzare metodi rapidi, specifici e sensibili per la diagnosi non solo di *M. tuberculosis* ma anche di Micobatteri non tubercolari direttamente nel campione clinico. L'identificazione dei micobatteri a livello di specie mediante metodi convenzionali (test biochimici) è lunga e laboriosa e comporta un ritardo nella diagnosi (da 2-3 settimane a 2-4 mesi). L'identificazione molecolare, al contrario, ha due vantaggi rispetto all'identificazione fenotipica: tempi di identificazione notevolmente ridotti e una identificazione più accurata. Negli ultimi anni sono state messe a punto diverse tecniche molecolari per la diagnosi rapida di *Mycobacterium* spp. direttamente da diversi campioni clinici (PCR-REA, Reverse cross blot hybridization, In situ hybridization etc.). Queste tecniche sono basate sull'utilizzo di sequenze specifiche quali sequenze di inserzione (IS), sequenze ribosomali specifiche etc., come targets molecolari per l'identificazione dei micobatteri direttamente da campione clinico. La completa conoscenza della sequenza dei genomi di *M. tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* BCG ha permesso inoltre di identificare altri targets da usare per scopi diagnostici. Sulla base della conoscenza della sequenza del cromosoma di *M. tuberculosis* sono stati messi a punto dei sistemi di Microarrays in cui potenzialmente tutti i geni del batterio possono essere saggiati. La sequenza del cromosoma di *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis* è completa al 90% e le stesse tecniche potranno essere applicate a questi micobatteri. Inoltre la conoscenza di diverse mutazioni in geni specifici responsabili di resistenze a diversi farmaci ha permesso lo sviluppo di tecniche per l'individuazione di batteri potenzialmente resistenti a diversi antibiotici senza dover aspettare la crescita batterica in coltura.

STUDIO DELLA RESISTENZA AI CARBAPENEMICI IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

Lagatolla C., E.A. Tonin, C. Bearzi, C. Giungato L. Dolzani, F. Gombac, A. Lavenia, F. Gionechetti, E. Banfi e C. Monti-Bragadin
Dip. Scienze Biomediche Università di Trieste

Uno dei problemi clinici emergenti, che genera grande preoccupazione, è la comparsa di una nuova classe di β -lattamasi, le metallo- β -lattamasi, coinvolte nella resistenza agli antibiotici carbapenemici che sono rimasti, in alcuni casi, l'ultimo presidio terapeutico per infezioni sostenute da gram negativi non fermentanti.

In questo studio sono stati raccolti ed esaminati 170 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*, isolati da materiale patologico e risultati resistenti all'imipenem con le normali procedure della routine diagnostica. Su tutti questi ceppi è stato cercato il gene *bla_{vim}* mediante dot blotting usando una sonda specifica marcata con digoxigenina. Tale ricerca ha dimostrato la presenza del gene in 84 ceppi isolati da 58 pazienti. Oltre la metà dei ceppi (45) proveniva da infezioni urinarie, con minor frequenza gli isolamenti riguardavano infezioni respiratorie profonde (15%) o lesioni purulente aperte (20%). La presenza del gene non è stata riscontrata in nessun ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* sensibile all'imipenem né in ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* con elevato grado di resistenza al farmaco. La presenza del gene è molto rara (1.14%) nei ceppi con MIC compresa tra 16 e 32 ug/ml di imipenem mentre è quasi regola (98.8%) in quelli con MIC ≥ 64 ug/ml.

La diffusione di ceppi produttori di imipenemasi sembra aver raggiunto nel nostro ambiente livelli preoccupanti, sia per l'elevato numero dei ceppi portatori del gene che sono stati riscontrati negli ultimi tempi sia per il fatto che i pazienti colpiti da queste infezioni erano ricoverati in 18 reparti diversi e, addirittura, 6 di questi erano pazienti ambulatoriali. La preoccupazione per il diffondersi di tali ceppi deriva anche dal fatto che la resistenza all'imipenem si associa nel 67.8% dei casi alla resistenza a tutti i farmaci saggiati, con l'eccezione del colistin. L'analisi genotipica mediante RAPD degli isolati clinici produttori dell'enzima ha individuato l'esistenza di quattro tipi diversi, il più diffuso dei quali raggruppa l'82.5% dei ceppi esaminati. Tra i ceppi rimanenti, il 14% apparteneva al secondo tipo, mentre due isolati presentavano profili elettroforetici completamente diversi. Rimangono da studiare i motivi di una così ampia diffusione di questo fattore di resistenza nella popolazione batterica da noi esaminata.

NUOVO METODO DI PCR COMPETITIVA PER LA DETERMINAZIONE DELLA CARICA VIRALE DEL VIRUS POLIOMA BK

Cavallo R., Bergallo M., Scutera S., Gregori G., Gribaudo G., Merlino C.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, Servizio Convenzionato di Virologia, Università degli Studi di Torino

L'associazione del Polyomavirus BK (BKV) con le nefriti interstiziali nei pazienti sottoposti a trapianto renale è di particolare interesse. Dopo l'infezione primaria il virus rimane latente nel parenchima renale e nelle cellule del tratto urogenitale; la riattivazione viene favorita in condizioni di immunosoppressione e può determinare in questi pazienti un'alterata funzionalità renale con perdita dell'organo trapiantato. La nefrite da virus BK è stata osservata nel 2-3% dei pazienti con trapianto di rene e sembra essere correlata con la presenza del DNA virale nel siero e con l'eliminazione del virus nelle urine. La rilevazione citologica nelle urine delle cellule ureterali di transizione ("decoy cells") infettate dal virus ha scarso valore predittivo e la conferma diagnostica prevede la dimostrazione del virus su biopsia renale. Quest'ultima è una tecnica invasiva, e quindi sarebbe estremamente utile avere a disposizione un test riproducibile di PCR quantitativa (qPCR) per determinare la carica virale su campioni sia di sangue che di urine. A tal fine abbiamo messo a punto una qPCR che prevede la costruzione di un plasmide competitore (pBK-C) contenente un frammento del virus BK, corrispondente all'antigene large T, a cui è stato aggiunto un frammento di DNA eterologo di 78 nucleotidi. Per selezionare i campioni positivi è stata condotta una PCR semi-quantitativa preliminare con l'aggiunta, in ogni campione, di 200 copie di plasmide competitore. In pratica, la determinazione del numero di genomi virali è stata effettuata confrontando l'intensità delle bande ottenute dall'amplificazione del DNA virale su campioni d'urina con l'intensità delle bande ottenute dall'amplificazione di diluizioni scalari di pBK-C da 10^2 a 10^5 allestite in parallelo. I campioni che hanno presentato un numero di genomi superiore a 10^3 sono stati saggiati in PCR competitiva, nella quale al DNA dei campioni è stato aggiunto il competitore pBK-C in diluizioni scalari da 10^2 a 10^5 . Con questo metodo è quindi possibile quantificare la carica virale come numero di genomi su volume di campione in un "range" compreso da 100 a 100.000 genomi.

INTEGRONI DI CLASSE 1 ED ANTIBIOTICO-RESISTENZE IN BATTERI GRAM-NEGATIVI ISOLATI DA *LARUS CACHINNANS*.

F. Gionechetti*, L. Dolzani*, F. Gombac*, A. Lavenia*, E.A. Tonin*, C. Lagatolla*, E. Banfi*, P. Zucca^ e C. Monti-Bragadin*.
Dipartimenti di Scienze Biomediche* e di Psicologia^, Università di TRIESTE. e-mail: Gionechetti@dsbmail.units.it

Per monitorare il livello di contaminazione ambientale da antibiotici e la conseguente diffusione di antibiotico-resistenze in ambienti diversi da quelli ospedalieri, si è voluta saggiare la sensibilità ad alcuni antibiotici e la presenza di integroni di classe 1 in ceppi di batteri gram-negativi isolati da pulli di gabbiano (*Larus cachinnans michahellis*) nidificante in zone disabitate del delta dell'Isonzo. Da 102 animali sono stati isolati 208 ceppi di *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* e *Salmonella*, in cui è stata ricercata la presenza di un'integrasi di classe 1 mediante *dot blot* utilizzando una sonda di 250 pb specifica per il gene *intI1*. Sono risultati positivi 25 ceppi (13 su 89 *P. mirabilis*, 8 su 76 *E. coli*, 4 su 26 *Klebsiella* e 0 su 17 *Salmonella*).

Amplificando il DNA batterico con una coppia di primer fiancheggiante la regione variabile dell'integrone, da tutti i ceppi positivi di *P. mirabilis*, da 7 su 8 ceppi di *E. coli* e da 3 su 4 di *Klebsiella* sono stati ottenuti frammenti di DNA di lunghezza variabile da 650 a 4800 pb. La diversa lunghezza delle bande ottenute riflette il numero di cassette di antibiotico-resistenza inserite nell'integrone, mentre in due casi in cui non si è ottenuta alcuna banda rappresentano probabilmente integroni vuoti.

Un inserto di 1600 pb è risultato essere il più comune, presente da solo o associato ad altri di lunghezza diversa negli amplificati di 9 *P. mirabilis*, di 3 *E. coli* e di una *Klebsiella*. Mediante digestione con l'endonucleasi *RsaI*, le bande di 1600 pb dei diversi ceppi hanno comunque dimostrato di possedere 3 diversi pattern di restrizione.

Il possesso di integroni di classe 1 nei diversi ceppi è positivamente correlato con le resistenze ad alcuni antibiotici, anche se per alcuni di questi, dai dati di letteratura, si può escludere la presenza dei relativi determinanti genetici all'interno dell'integrone.

La tipizzazione mediante il test di Dienes dei 13 *P. mirabilis* ha dimostrato che ceppi appartenenti ad uno stesso gruppo possono possedere integroni differenti.

Tra i batteri gram negativi isolati da una specie animale come il gabbiano esiste quindi una sorprendente ricchezza e varietà genotipica e fenotipica di determinanti dell'antibiotico-resistenza, che verranno studiati con maggiore dettaglio anche per il progressivo inurbamento di questa specie.

RAPIDA IDENTIFICAZIONE DI AGENTI VIRALI NEI MITILI MEDIANTE AMPLIFICAZIONE GENICA.

Manzara S., P. Cattani, A. Deriu*, S. Zanetti* e G. Fadda

Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

* Istituto di Microbiologia Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari

La ricerca e l'identificazione di agenti virali patogeni in estratti tissutali di mitili presenta notevoli difficoltà. La messa a punto di un metodo che sia sensibile e rapido nell'affrontare due aspetti fondamentali, quali la separazione dei virus dai tessuti e la loro concentrazione, per procedere poi ad una identificazione tramite metodiche di biologia molecolare è quindi una tappa fondamentale di questo studio.

La bassa carica virale e la forte presenza di contaminazioni esterne, oltre l'importanza della riduzione dei tempi di esame e la ricerca di virus non coltivabili o che non danno luogo ad effetto citopatico, fanno preferire le tecniche di biologia molecolare al saggio d'infettività su colture cellulari. D'altra parte, la presenza di inibitori delle reazioni di amplificazione genica rende necessaria la messa a punto di una metodica in grado di superare questo problema e quindi la possibilità di risultati falsi negativi.

In questo lavoro è stata valutata l'efficacia di un metodo di trattamento di campioni ottenuti da un omogenato di tessuto di mitili bivalvi per l'identificazione di virus ad RNA e a DNA.

È stata esaminata una serie di campioni costituiti da diversi tipi di mitili provenienti da differenti località marine della Sardegna. Preparazioni di RNA ottenute da ciascun campione adeguatamente trattato sono state quindi sottoposte ad amplificazione genica mediante RT-PCR per la ricerca di Enterovirus. L'efficacia del trattamento di concentrazione ed estrazione è stata valutata allestendo opportuni controlli positivi con Poliovirus tipo 2 vaccinale, Echovirus 30 ed Coxsackievirus B3. Parallelamente è stata valutata la possibilità di ricercare nelle stesse preparazioni anche DNA genomico virale, amplificando come controllo virus erpetici. I risultati ottenuti dall'analisi dei primi otto campioni analizzati sembrano incoraggianti, avendo dimostrato la presenza di Enterovirus in tre di questi. La possibilità di valutare la presenza di virus responsabili di gastroenteriti virali in alimenti di origine animale rappresenta un valido strumento per il monitoraggio e il controllo delle infezioni virali del tratto gastroenterico.

ASSOCIAZIONE TRA BATTERI PARODONTOPATOGENI, HERPESVIRUS E MALATTIA PARODONTALE

Santangelo R, S. D'Ercole**, R. Graffeo, G. Deli*, R. Piccolomini**, P. Cattani, A. Nacci e G. Fadda

Istituti di Microbiologia e di *Clinica Odontoiatrica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

**Dipartimento di Scienze Biomediche, Laboratorio di Microbiologia Clinica, Università G. D'Annunzio, Chieti

La Malattia Parodontale è una malattia infettiva che riconosce come agenti eziologici batteri gram negativi quali, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) e *Prevotella intermedia* (P.i.). Recentemente è stato ipotizzato che alcuni Herpesvirus umani quali, *Herpes Simplex* di tipo 1 (HSV1), *Virus di Epstein-Barr* (EBV) e *Cytomegalovirus* (CMV), possano svolgere un ruolo nello sviluppo o nella progressione della malattia.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare il ruolo dei diversi microrganismi nelle diverse forme di Malattia Parodontale, mediante metodiche di diagnostica molecolare.

Sono stati esaminati 66 campioni subgingivali ottenuti da 66 pazienti (22 con Early-Onset Peridontitis (EOP), 22 con Parodontite cronica dell'adulto (PC) e 22 soggetti sani) afferenti all'ambulatorio di Clinica Odontoiatrica del Policlinico "A. Gemelli" dell'Università Cattolica del Sacro Cuore.

Eseguita l'estrazione degli acidi nucleici, i campioni sono stati analizzati mediante reazione polimerasica a catena (PCR), utilizzando due multiplex PCR, una per la ricerca simultanea dei batteri ed una per i virus. Frammenti di amplificazione specifici di diverso peso molecolare per ciascun microrganismo sono stati rilevati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

E' stata riscontrata una elevata correlazione tra la presenza dei batteri parodontopatogeni e le due diverse forme di malattia parodontale. Infatti nei campioni ottenuti da pazienti con EOP e PC la prevalenza complessiva è stata del 77% per A.a., maggiore del 82% per P.g. e maggiore del 59% per P.i.. Nei soggetti sani tali valori si riducono al 14% per A.a., al 23% per P.g. e al 27% per P.i..

I risultati relativi alla determinazione degli Herpesvirus mostrano la presenza di HSV1 ed EBV rispettivamente nel 14% e 18% dei pazienti con malattia parodontale, mentre CMV è presente nel 27% dei pazienti con EOP e nel 9% di quelli con PC. Nei soggetti sani sono stati riscontrati solo EBV e CMV rispettivamente nel 9% e nel 32% dei casi.

In conclusione, i risultati ottenuti confermano la stretta associazione tra i tre batteri parodontopatogeni e lo sviluppo di lesioni parodontali, mentre non sembrano evidenziare una correlazione significativa tra gli Herpesvirus e la malattia parodontale.

RUOLO DEL CD14 E DEL CD11a/CD18 NEL RILASCIO DI TNF- α , IL-6 ED IL-8 INDOTTO DALLE PORINE DI SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM IN CELLULE THP-1

Mariateresa Vitiello¹, Marilena Galdiero², Marina D'Isanto¹, Emiliana Finamore¹, Lucia Peluso¹ and Massimiliano Galdiero²

¹ Dipartimento di Patologia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli

² Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli

Il lipopolisaccaride (LPS) dei batteri Gram-negativi, così come alcuni componenti di superficie dei batteri Gram-positivi utilizzano il CD14 e le integrine CD11a/CD18 quali recettori cellulari per indurre l'espressione ed il rilascio di citochine.

I meccanismi molecolari con cui l'LPS attiva la risposta cellulare non sono ancora ben conosciuti. Uno dei modelli proposti suggerisce la possibilità che sia proprio il CD14 a funzionare come una proteina carrier simile all'albumina capace di legare, in maniera aspecifica, una grande varietà di molecole, trasferendole ad un'altra non identificata molecola cellulare stimolando una risposta immune-specifica.

In accordo con questo modello e considerando la similarità tra le attività biologiche dell'LPS e quelle delle porine, proteine della membrana esterna dei batteri Gram-negativi, abbiamo verificato il possibile coinvolgimento dei recettori CD14 e delle integrine CD11a/CD18 nel rilascio di citochine in monociti umani di linea (THP-1) stimolati con porine di *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

E' noto che le cellule THP-1 sottoposte a trattamento con vitamina D esprimono in superficie il recettore CD14. I nostri risultati mostrano che la stimolazione delle cellule THP-1 trattate con vitamina³ D e successivamente con porine (50-5000 ng/ml) o LPS (10-1000 ng/ml), induce, in maniera dose-dipendente, un notevole aumento³ del rilascio di TNF- α , IL-6 ed IL-8 rispetto ai controlli. L'aggiunta, alle cellule THP-1 pretrattate con vitamina D, di anticorpi monoclonali anti-CD14, inibisce significativamente la produzione di citochine indotta da LPS ma non quella² da porine. Il pretrattamento con anticorpi monoclonali anti-CD11a comporta una riduzione del 50% nel rilascio di TNF- α e del 25-35% di IL-6 ed IL-8 nelle cellule trattate con LPS; anticorpi anti-CD18 riducono di circa 20-35% il rilascio delle tre citochine indotto dall'LPS. In seguito a stimolazione con porine, le cellule pretrattate con anticorpi monoclonali anti-CD11a/CD18 presentano una riduzione del 20-25% del rilascio delle tre citochine dosate.

I dati ottenuti suggeriscono che il meccanismo di stimolazione che coinvolge la sintesi di TNF- α , IL-6 ed IL-8 mediata dalle porine di *Salmonella enterica serovar Typhimurium* in cellule THP-1 pretrattate con vitamina D è indipendente dal recettore CD14 ma risulta parzialmente modulato dalle integrine CD11a/CD18.³

EFFETTO DELLE PORINE DI *S. typhimurium* SULLA COAGULAZIONE EMATICA: IMPLICAZIONE NELLA PATOGENESI DELLO SHOCK SETTICO NELLA CID.

P. CATALANOTTI^a, B. DI MICCO^b, S. METAFORA^d, P. DI MICCO^b, A. BARONI^c, G. SCARALLO^a, M.A. TUFANO^a
^aDip. di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia clinica, ^bDip. di Biochimica e Biofisica "F. Cedrangolo", ^cDip. di Dermatologia, Seconda Università di Napoli, ^dIIGB, Napoli.

Sono stati studiati gli effetti delle porine di *S. typhimurium* sulla coagulazione del sangue umano. E' stato dimostrato che le proteine maggiori della parete esterna dei batteri Gram negativi, a concentrazioni micromolari, accelerano sensibilmente la coagulazione del sangue umano *in vitro*. In particolare, le porine, ma non LPS, riducono il tempo di ricalcificazione, ma non influenzano il tempo di protrombina, il PTT attivato e il test della protrombina serica residua. Queste proteine non modificano i livelli di AT e del complesso TAT, viceversa, durante la coagulazione del sangue incrementano l'attività esterasica della trombina. Viene discusso il ruolo delle porine nella patogenesi della coagulazione intravascolare disseminata (CID) alla luce del loro effetto procoagulante

LE FORME VITALI MA NON COLTIVABILI DI *ENTEROCOCCUS FAECALIS* CONSERVANO ED ESPRIMONO IL GENE *vanB* RESPONSABILE DELLA RESISTENZA ALLA VANCOMICINA

M.M. Lleo*, B. Bonato, M.C. Tafi, S. Ugolini, P. Canepari

Dipartimento di Patologia, Sezione Microbiologia, Università di Verona.

E' ben nota la capacità degli enterococchi di scambiare materiale genico *intra e/o inter-genera*. Di particolare rilevanza medica è lo scambio di geni che codificano per l'antibiotico-resistenza. Come conseguenza di questo fenomeno biologico, di recente, si è osservato un significativo aumento anche degli enterococchi resistenti alla vancomicina. *Enterococcus faecalis* fa parte della normale flora dell'intestino nell'uomo e negli animali e viene pertanto considerato un utile indicatore di contaminazione fecale. Quando questo microrganismo viene rilasciato nell'ambiente, ove la bassa disponibilità di nutrienti non permette la sua crescita, esso attiva un meccanismo di sopravvivenza, noto come lo "stato vitale ma non coltivabile" (VBNC), che gli permette di conservare per alcuni mesi la propria vitalità anche in assenza di divisione cellulare. Per questo motivo si può ipotizzare che le forme vitali non coltivabili possano costituire un ulteriore serbatoio ambientale di forme infettive e/o resistenti agli antibiotici con conseguenti gravi ripercussioni sulla salute dell'uomo.

In questo studio è stata valutata la capacità del ceppo V583 di *E. faecalis* di conservare ed esprimere, anche in stato VBNC, il gene *van B* responsabile della resistenza alla vancomicina. A tale scopo, lo stato VBNC veniva indotto inoculando cellule di *E. faecalis* in un microcosmo oligotrofo mantenuto a 4°C fino al raggiungimento della loro totale incoltivabilità. Da cellule VBNC veniva estratto e purificato l'RNA e questo era sottoposto a retrotrascrizione con successiva amplificazione del corrispondente cDNA (RT-PCR) utilizzando una coppia di primer selezionati nella sequenza nucleotidica del gene *vanB*. I risultati ottenuti hanno consentito di accertare che le cellule mantenute per un mese in stato VBNC erano ancora in grado di esprimere il gene *vanB*. E' stata inoltre dimostrata la capacità di una parte della popolazione VBNC di *E. faecalis* (10³ su 10⁷ cellule) di recuperare la divisione e di esprimere la vancomicina-resistenza dopo il ripristino di condizioni favorevoli incubando le cellule VBNC a 22°C in un terreno di coltura arricchito e contenente la vancomicina.

Sulla base dei dati ottenuti si suggerisce un potenziale ruolo delle forme VBNC di *E. faecalis* nel mantenimento e nella diffusione della resistenza alla vancomicina.

NUOVO METODO PER LA VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTITUBERCOLARE

Scialino G, Banfi E^o, Dolzani L, Gionechetti F, Gombac F, Lagatolla C, Lavenia A, Mamolo * MG, Tonin EA e Monti-Bragadin C.

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione Microbiologia, Università di Trieste.

^oe-mail: banfi@dsbmail.units.it

* Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Trieste.

La diffusione di ceppi multiresistenti di *M.tuberculosis* e la limitata scelta di chemioterapici di impiego corrente rendono di rilevante interesse sia la messa a punto di metodiche per la determinazione rapida della sensibilità ai chemioterapici che la ricerca di nuove molecole antitubercolari. Abbiamo valutato un nuovo saggio per determinare la MIC di composti con potenziale attività antitubercolare. Si tratta di un micrometodo che utilizza la resazurina (Chem.Pharm.Bull. 1990, 38: 3466) come indicatore di vitalità dei micobatteri. Abbiamo determinato le MIC di isoniazide, rifampicina, streptomina, etambutolo su *M.tuberculosis* H37Rv mettendo a punto le condizioni colturali del ceppo, la concentrazione dell'inoculo e la durata dell'incubazione. Con la stessa metodica abbiamo valutato l'attività antimicobatterica di una serie di derivati del piridincarbosamidrazone (Il Farmaco 1999, 54: 761). Confrontando i valori delle MIC ottenute con il micrometodo con quelli ottenuti mediante agar-diluizione non abbiamo osservato differenze significative di risposta tra i due saggi, con una maggiore variabilità per la streptomina. I derivati del piridincarbosamidrazone hanno manifestato una buona attività antimicobatterica, con valori di MIC compresi tra 1 e 8 µg/ml. Il nuovo metodo colorimetrico di microdiluzione assicura una risposta riproducibile, rapida in una settimana e con costi limitati. Si propone il suo impiego per determinare le MIC di antitubercolari di prima e seconda scelta e anche di composti chimici di nuova sintesi su ceppi sensibili e/o multiresistenti di *Mycobacterium spp.* di isolamento clinico.

ASSOCIAZIONE TRA FENOTIPO/GENOTIPO DI ERITROMICINO-RESISTENZA E GENI *prtF1* IN CEPPI FARINGEI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Gloria Magi, Cinzia Spinaci, Eleonora Giovanetti, Pietro E. Varaldo, Bruna Facinelli

* Istituto di Microbiologia-Facoltà di Medicina e Chirurgia-Università di Ancona

Da un nostro recente studio, è emersa un'inaspettata associazione tra resistenza ad eritromicina e capacità di invadere cellule respiratorie in ceppi faringei di *Streptococcus pyogenes* isolati in Italia. La capacità invasiva era associata alla presenza del gene *prtF1*, presente in tutti i ceppi con fenotipo cMLS [*ermB* (*ermAM*)] ed iMLS [iMLS-A, *ermAM*; iMLS-B e iMLS-C, *ermTR*] e nella maggioranza dei ceppi con fenotipo M [*mefA*]. Il gene *prtF1* codifica per F1, un'adesina che lega la fibronectina ed è la principale responsabile della capacità invasiva degli streptococchi. RD2, un dominio di F1 per il legame alla fibronectina, è composto da 5 ripetizioni di 37 aminoacidi completamente ripetuti 4 volte ed 1 volta solo parzialmente ripetuti. RD2 del gene *prtF1* è composto di 5 ripetizioni, ciascuna di 111 bp, salvo l'ultima costituita da 96 bp, anche se sono stati descritti geni *prtF1* con un numero di ripetizioni RD2 variabile [2-6]. In questo studio, abbiamo analizzato il dominio RD2 di *prtF1* di 77 ceppi di *S. pyogenes* isolati da faringotonsillite (66 ceppi eritromicina-resistenti ed 11 ceppi eritromicina-sensibili). RD2 è stato amplificato mediante PCR utilizzando primers complementari alle regioni adiacenti. Nei 77 ceppi analizzati, l'ampiezza degli amplificati variava da ca. 100 a ca. 550 bp, indicando un numero di ripetizioni da 1 a 5. Questi risultati dimostravano la presenza di 5 diversi geni *prtF1* nei ceppi eritromicina-resistenti ed eritromicina-sensibili studiati. Nei ceppi eritromicina-resistenti, erano presenti più frequentemente 3 differenti geni *prtF1* (4, 3 ed 1 ripetizioni). In particolare, *prtF1* era presente con 4 ripetizioni in tutti i ceppi iMLS-A (*ermAM*) e con 3 ripetizioni in tutti i ceppi iMLS-B e iMLS-C (*ermTR*), mentre era composto da un numero di ripetizioni variabile nei ceppi cMLS (*ermAM*), M (*mefA*) e nei ceppi sensibili. Questi risultati dimostrano un'associazione tra fenotipo/genotipo di resistenza e geni *prtF1*: l'associazione è particolarmente evidente tra *ermAM* ed *ermTR* e geni *prtF1* con 4 e 3 ripetizioni in RD2, rispettivamente. In generale, questi risultati supportano l'ipotesi che i ceppi faringei eritromicina-resistenti di *S. pyogenes* in circolazione in Italia siano il risultato dell'acquisizione di differenti geni per l'eritromicina-resistenza da parte di pochi cloni invasivi contenenti differenti geni *prtF1*.

ASSOCIAZIONE DEI DETERMINANTI DI RESISTENZA AL CADMIO, *CADD* E *CADX*, IN CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CHE MOSTRANO BASSI LIVELLI DI RESISTENZA ALLA METICILLINA.

O. Massidda¹, M. Mingoa², M.P. Montanari², D. Fadda¹, P.E. Varaldo².

¹Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Sez. di Microbiologia, Università di Cagliari, Italia; ²Istituto di Microbiologia, Università di Ancona, Italia.

I ceppi di *Staphylococcus aureus* con ridotta sensibilità o resistenza alla meticillina (ceppi “borderline”) costituiscono un gruppo di stafilococchi piuttosto omogeneo, spesso causa di infezioni nosocomiali. Essi mostrano una resistenza a basso livello nei confronti della meticillina e delle altre penicilline penicillinasi-resistenti (PRP), cioè valori di MIC intermedi, a cavallo tra la sensibilità piena e la resistenza e inoltre presentano alcune caratteristiche distintive quali: (i) la produzione di una seconda β -lattamasi, in aggiunta alla penicillinasi classica, capace di idrolizzare le PRP ed il PADAC; (ii) la presenza di un plasmide di 17.2 kb che contiene i geni *bla* (*blaZ*, *blaR1* e *blaI*) necessari per la produzione della penicillinasi; (iii) l'appartenenza al gruppo fagico 94/96; e (iv) un particolare ribotipo. Allo scopo di caratterizzare il plasmide di 17.2 kb, associato ai ceppi di *S. aureus* “borderline”, abbiamo clonato in *Escherichia coli* e sequenziato i quattro frammenti caratteristici originati dalla digestione del DNA plasmidico estratto dal ceppo “borderline” prototipo a53, dopo digestione con l'enzima di restrizione *HindIII*. L'analisi di sequenza ha evidenziato che il plasmide di 17.2 kb contiene un'intera copia del trasposone *Tn552*, nel quale sono localizzati i geni *bla* necessari alla produzione della penicillinasi, e una serie di altri geni caratterizzati sulla base della loro omologia con geni conosciuti. Di particolare interesse sono risultati due geni, localizzati nel frammento *HindIII* di 3.9 kb, omologhi ai determinanti di resistenza al cadmio, *cadB-cadX*, di *Staphylococcus lugdunensis* e ai determinanti *cadD-cadX* recentemente riscontrati, sebbene in forma troncata, sul plasmide pRWO01 in *S. aureus*. La determinazione della resistenza al cadmio mediante metodi spettrofotometrici, saggi di sensibilità su piastra ed esperimenti di PCR utilizzando primer specifici per la regione del *cadD-cadX* hanno dimostrato la presenza di tali geni, in forma completa, in tutti i ceppi di *S. aureus* “borderline” saggiati. I geni *cadD-cadX*, presenti in forma completa in questi ceppi, rappresentano marcatori ulteriori associati alla resistenza “borderline” in *S. aureus*, evidenziando la possibilità di utilizzare questi marcatori, da soli o con altri, per una identificazione rapida ed accurata di questo gruppo di stafilococchi.

SVILUPPO DI UN PROTOCOLLO DI RT-PCR DA APPLICARE ALLA RICERCA DI mRNA BATTERICO IN CAMPIONI AMBIENTALI

B. Bonato*, M.M. Lleo, S. Ugolini, M.C. Tafi, C. Signoreto, P. Canepari

Dipartimento di Patologia, Sezione Microbiologia, Università di Verona

Una parte dell'eterogenea popolazione microbica presente nell'ambiente è costituita da batteri che, in risposta a condizioni avverse, sviluppano strategie di sopravvivenza, come lo “stato vitale ma non coltivabile” (VBNC), al fine di conservare la propria vitalità nonostante il blocco della divisione. Questa popolazione batterica, attualmente, non viene tenuta in considerazione in quanto il monitoraggio della qualità microbiologica dell'ambiente viene di norma condotto utilizzando metodi colturali standard i quali non rilevano la presenza di tali forme microbiche. I più recenti dati sperimentali indicano che la maggior parte dei batteri di interesse medico è in grado di attivare lo stato VBNC. Tali forme batteriche conservano il proprio potenziale patogeno e, in certe condizioni, possono tornare alla attiva moltiplicazione. Per questi motivi, le forme VBNC potrebbero rappresentare un potenziale rischio per l'ambiente e per la salute dell'uomo. Questo è anche suffragato dall'osservazione che in un'alta percentuale delle infezioni causate da microrganismi di origine ambientale non viene isolato l'agente eziologico. Pertanto, il ruolo delle forme batteriche in stato VBNC come agenti di infezione e come serbatoio di forme infettive persistenti nell'ambiente dovrebbe essere tenuto in attenta considerazione.

Lo scopo di questo studio è stato di allestire un protocollo basato sulla tecnica della PCR al fine di rilevare la presenza nell'ambiente di cellule vitali, in forma coltivabile e/o non coltivabile, di *Enterococcus faecalis*. Tale protocollo prevede la cattura del mRNA, dopo lisi degli enterococchi, mediante l'utilizzo di biglie magnetiche ricoperte di un primer complementare alla sequenza nucleotidica del gene *php5*. La scelta di questo specifico bersaglio è stata effettuata sulla base non solo della sua specie-specificità, ma soprattutto in funzione della sua espressione anche durante la fase VBNC. Si procede successivamente alla retrotrascrizione del mRNA e alla amplificazione mediante PCR del corrispondente cDNA. Il protocollo, validato in laboratorio su cellule in stato VBNC, si è dimostrato altamente specifico, sensibile, di rapida esecuzione (non necessita infatti di purificazione del RNA né di digestione del DNA cromosomico) e utile al fine di ovviare alla presenza di sostanze inibenti la PCR che, assai frequentemente, sono contenute nei campioni ambientali.

INFEZIONE DI CELLULE EPITELIALI INTESTINALI POLARIZZATE DA PARTE DI COXSACKIEVIRUS B: RILASCIO VETTORIALE DELLA PROGENIE VIRALE ATTRAVERSO LA MEMBRANA APICALE

Serra C.¹, Uzzau S.¹, Delogu G.¹, Bottelli A.², Baj A.², Cappuccinelli P.¹, Conaldi P.G.²

¹Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

²Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università dell'Insubria

I coxsackievirus B (CVB) sono agenti patogeni ad elevata prevalenza e causano numerose manifestazioni cliniche, assai diversificate per sintomatologia e gravità. Malgrado che i CVB siano trasmessi per via orofecale, le caratteristiche dell'interazione di questi agenti virali con le cellule intestinali non sono note. Le cellule epiteliali polarizzate dell'intestino rappresentano la barriera primaria dell'ospite nei confronti dei CVB prima della loro disseminazione per via ematica. Per questo motivo abbiamo studiato gli effetti dell'interazione dei CVB con linee di cellule intestinali (T84 e Caco-2) sia in condizioni basali che polarizzate. Lo stato di polarizzazione è ottenuto facendo crescere le cellule su membrane "transwell" e valutando progressivamente la resistenza elettrica del monostrato cellulare. Con test di immunofluorescenza e di RT-PCR abbiamo rilevato che le cellule intestinali studiate esprimono sia CD55 che HCAR, i principali recettori dei CVB. Le cellule intestinali si sono dimostrate suscettibili ad una infezione produttiva da CVB, ma lo stato di polarizzazione risulta associato ad un ritardo nella manifestazione dell'effetto citopatico conseguente alla replicazione virale. L'uptake dei CVB appare più efficiente nel caso in cui l'inoculo virale venga effettuato a livello della porzione apicale delle cellule intestinali piuttosto che di quella basolaterale. La compartimentalizzazione dei recettori virali che tali risultati suggeriscono è stata dimostrata da studi con microscopio confocale che hanno evidenziato una progressiva distribuzione del CD55 in posizione apicale in coincidenza con il processo di polarizzazione cellulare. Il rilascio della progenie virale avviene in quantità nettamente prevalente dalla membrana apicale anche nel caso in cui l'assorbimento sia stato effettuato attraverso la superficie basolaterale delle cellule intestinali. La replicazione dei CVB determina alterazioni del citoscheletro ed una riduzione della resistenza transepiteliale rilevabili prima dello sviluppo di un effetto citopatico conclamato. Questi risultati indicano che le cellule epiteliali intestinali polarizzate vanno incontro ad una infezione vettoriale da parte dei CVB e sembra avere interessanti implicazioni sulla patogenesi delle infezioni da CVB in vivo.

ASPETTI ULTRAISTRUTTURALI MEDIANTE MICROSCOPIA A SCANSIONE DI ALTERAZIONI DI CATETERI VASCOLARI E DELLA LORO COLONIZZAZIONE MICROBICA.

Rossi A.*, Donelli G.***, Leone F.*, Mazzella P.*, Spagnolo N.* e Fadda G.*

*Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma ** Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

INTRODUZIONE

L'impiego di cateteri vascolari costituisce un notevole sostegno terapeutico per molti tipi di patologie. Tuttavia tali dispositivi possono risultare per molti microrganismi un ottimo substrato di crescita, dovuto sia alla formazione di biofilm sia alla eventuale presenza di alterazioni strutturali. In molti casi ne deriva una massiva colonizzazione e uno sviluppo di infezioni e la conseguente perdita di efficacia di tale dispositivo.

Infatti è noto che alterazioni di superficie come microcavità e microfratture oppure la formazione di un biofilm (albumina, fibrinogeno ecc.) da parte del paziente rappresentano condizioni favorevoli per i microrganismi a colonizzare la superficie dei cateteri, in quanto forniscono loro protezione contro l'azione dei fagociti e degli agenti antimicrobici. Inoltre peculiari proprietà dei microrganismi quali adesine polisaccaridiche, pili, glicocalice o la produzione di "slime" possono essere un ulteriore fattore predisponente alla colonizzazione.

OBIETTIVO

Obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare mediante indagini microbiologiche (vedi Poster Spagnolo N. et al.) e analisi ultrastrutturale, mediante microscopia a scansione, eventuali modificazioni della superficie di cateteri venosi centrali, provenienti da pazienti, solitamente immunocompromessi, ricoverati presso vari reparti del Policlinico "A.Gemelli" di Roma e le infezioni ad esse correlate.

RISULTATI

Il nostro studio si è svolto nell'arco di tre anni e sono stati complessivamente esaminati 3261 cateteri. I campioni positivi alle indagini microbiologiche sono stati sottoposti ad analisi mediante microscopia a scansione, esaminandone tre segmenti corrispondenti alla punta, tratto intermedio e tratto distale. Si sono osservate alterazioni di superficie quali microcavità, microfratture e materiale non polimerizzato. In molti casi la colonizzazione microbica era massiva e talvolta con più di una specie microbica. Sono stati esaminati anche cateteri nuovi, non impiantati, al fine di valutare la presenza di eventuali difetti di fabbricazione.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno evidenziato la necessità di un'indagine più approfondita sulle caratteristiche qualitative dei cateteri, in particolare fabbricazione al fine di valutare se i differenti materiali impiegati nella fabbricazione possano influire sulla colonizzazione del catetere stesso.

RESISTENZA AI CARBAPENEMI IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: RUOLO DELLE METALLO-B-LATTAMASI ACQUISITE

L. Pallecchi C. Castagnini, M.L. Riccio, J.D. Docquier, R. Fontana*, G.M. Rossolini

Dipartimento di Biologia Molecolare, Sez. di Microbiologia, Università di Siena, e *Dipartimento di Patologia, Sez. di Microbiologia, Università di Verona

Il problema delle chemioresistenze in *Pseudomonas aeruginosa* è oggi di grande attualità per la comparsa, in questo importante patogeno opportunisto, di metallo-β-lattamasi acquisite in grado di compromettere l'efficacia terapeutica della maggior parte dei β-lattamici, compresi i carbapenemi. In Italia, isolati clinici di *P. aeruginosa* resistenti ai carbapenemi e produttori di metallo-β-lattamasi acquisite di tipo VIM o IMP sono stati identificati a partire dalla fine degli anni '90. In questi ceppi, tuttavia, agli alti livelli di resistenza ai carbapenemi possono contribuire non solo la produzione del metallo-enzima ma anche la contemporanea presenza di altri meccanismi di resistenza (iperproduzione di AmpC, alterazioni della permeabilità, sistemi di efflusso). In questo lavoro è stato studiato il contributo dei metallo-enzimi al fenotipo di resistenza in ceppi di riferimento di *P. aeruginosa* ed *Escherichia coli*.

I plasmidi pAX22, pVR193 e pPAM-101, ottenuti da isolati clinici e contenenti rispettivamente i determinanti bla_{VIM-1} , bla_{VIM-2} , e bla_{IMP-1} e subcloni contenenti i determinanti di resistenza in un vettore "shuttle" per *E. coli* e *P. aeruginosa*, sono stati introdotti mediante elettroporazione in *P. aeruginosa* PAO-1 e in *E. coli* DH5α. È stato inoltre costruito un derivato di PAO-1 con il gene bla_{VIM-1} integrato nel cromosoma. Di ciascun trasformatante sono state quindi valutate le sensibilità ai carbapenemi e l'attività enzimatica.

L'analisi dei risultati ha evidenziato che: i) l'acquisizione di un plasmide con un determinante di tipo bla_{VIM} o bla_{IMP} induce in PAO-1 livelli di resistenza ai carbapenemi estremamente elevati (CMI variabili da 512 a >2048 μg/ml) anche in assenza di altri meccanismi di resistenza; ii) il dosaggio genico influenza significativamente il livello di resistenza, come dimostrato dai minori valori di CMI (comprese tra 64 e 128 μg/ml) se il determinante è integrato nel cromosoma; iii) in condizioni di attività enzimatica paragonabile le CMI per *E. coli* rimangono molto più basse (comprese nei valori di sensibilità, secondo i parametri del NCCLS) di quelle per *P. aeruginosa*.

BASI MOLECOLARI PER L'INCREMENTO DI RESISTENZA AI MACROLIDI IN *STREPTOCOCCUS PYOGENES* OSSERVATO IN UN'AREA EPIDEMIOLOGICA CIRCOSCRITTA

Stefania Cresti, Simona Pollini*, Maria Lattanzi, Francesca Montagnani, Elena Pilli*, Carla Cellesi, Gianni Pozzi* e Gian Maria Rossolini*

Istituto di Malattie Infettive e *Dipartimento di Biologia Molecolare – Sezione di Microbiologia, Università di Siena, Policlinico Le Scotte, 53100 Siena

Una analisi di 299 isolati clinici consecutivi e nonduplicati di *Streptococcus pyogenes*, raccolti nell'area Senese nel corso di 6 anni (1992-1997), ha mostrato un progressivo e significativo incremento della percentuale di resistenza ai macrolidi (dal 9% nel 1992 al 53% nel 1997; $p < 0.001$). Lo studio dei fenotipi di resistenza, effettuato mediante metodica del triplo disco,¹ ha mostrato che l'incremento è stato causato da un aumento della circolazione di ceppi con fenotipo di resistenza di tipo MLS, mentre la prevalenza dei ceppi con fenotipo M non ha mostrato variazioni significative durante il medesimo periodo. La caratterizzazione molecolare dei determinanti di resistenza, effettuata mediante ibridazione con sonde specifiche e con reazione a catena della polimerasi, ha mostrato che i ceppi con fenotipo MLS erano più frequentemente (84%) portatori di determinanti di tipo *erm*(AM), e meno frequentemente (16%) di determinanti di tipo *erm*(TR). Una analisi della diversità clonale dei ceppi, basata sulla genotipizzazione con elettroforesi in campo elettrico pulsato, ha mostrato una notevole eterogeneità sia tra i ceppi sensibili che tra quelli resistenti. Lo studio degli elementi genetici portatori dei determinanti *erm*(AM), basato sull'analisi dei polimorfismi di restrizione delle regioni fiancheggianti il gene di resistenza, ha mostrato una ampia variabilità. Nel complesso, i risultati delle analisi molecolari suggeriscono che l'incremento dei ceppi con fenotipo MLS sia stato causato da molteplici meccanismi, e che una diffusione "epidemica" di elementi genetici portatori del determinante *erm*(AM) tra la popolazione streptococcica circolante abbia svolto un rilevante contributo.

1. Giovanetti E, Montanari MP, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1935-1940.

POLIMORFISMO DEI GENI *KATG* E *GYRA* DI *M. TUBERCULOSIS* E TRASMISSIONE DELLA TUBERCOLOSI

Dolzani, L., M. Rosato, B. Sartori, E. Banfi, C. Lagatolla, M. Predominato, C. Fabris, F. Gombac, F. Gionecchetti, A. Lavenia, E. Tonin e C. Monti-Bragadin

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Trieste, via Fleming, 22, 34127 Trieste e Modulo di Microbiologia Polmonare, Ospedale di Cattinara, Trieste.

Il ritrovamento di *markers* associabili ad una maggiore trasmissibilità del *Mycobacterium tuberculosis* costituirebbe un deciso avanzamento per il contenimento delle infezioni da esso causate. Uno studio relativamente recente (Sreevatsan et al. (1997) PNAS 94:9869-9874) ha dimostrato che tutti i ceppi di *M. tuberculosis* possono essere suddivisi in tre gruppi, sulla base della combinazione di due possibili polimorfismi, rilevabili rispettivamente al codone 463 del gene *katG* e al codone 95 del gene *gyrA*. Lo stesso lavoro attribuiva ai ceppi dei gruppi 1 e 2 una maggiore tendenza alla diffusione, rispetto ai ceppi del gruppo 3, che sembravano dare piuttosto infezioni sporadiche. Questi risultati sono stati tuttavia messi in discussione da lavori successivi (Rhee et al. (1999) J. Clin. Microbiol. 37:1764-1770).

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di verificare se ceppi isolati da casi di tubercolosi per i quali fosse ipotizzabile una trasmissione recente dell'infezione fossero associabili ad uno dei tre gruppi individuati dai polimorfismi *katG*-463 *gyrA*-95. A questo scopo, è stata studiata una collezione di 51 ceppi, isolati consecutivamente durante il periodo 1996-1997 nella provincia di Trieste. Come parametro di riferimento per la trasmissione dell'infezione è stata utilizzata l'appartenenza dei ceppi a *cluster* derivati dall'analisi IS6110-RFLP, integrata con la DRE-PCR.

Dei 51 isolati analizzati, 35 (69%) davano *fingerprints* unici, dimostrando così la loro eterogeneità clonale. I rimanenti 16 (31%) erano raggruppabili in 6 *clusters*, ciascuno contenente da 2 a 4 isolati. I pazienti dei ceppi appartenenti a *cluster* avevano un'età media significativamente più bassa di quelli non appartenenti a *cluster*, ed in alcuni casi è stato possibile confermare, attraverso la storia dei pazienti, l'ipotesi che si sia avuta trasmissione. L'analisi del polimorfismo *katG* 463 *gyrA*-95 ha rivelato una stretta associazione degli isolati raggruppabili in *clusters* con il gruppo 2. I nostri risultati pertanto suggeriscono la possibilità di una maggiore tendenza alla trasmissione dei ceppi appartenenti a questo gruppo.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA E BURKHOLDERIA CEPACIA IN PAZIENTI AFFETTI DA FIBROSI CISTICA: IDENTIFICAZIONE ED EPIDEMIOLOGIA.

P. Cipriani¹ e M. Nicoletti².

¹Dip. Di Scienze di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza", Roma e ²Dip. Di Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti.

La colonizzazione microbica cronica delle vie aeree superiori è la causa principale di morbosità e mortalità nei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Oltre a *Pseudomonas aeruginosa*, i principali microrganismi responsabili delle infezioni nei pazienti con FC sono *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* ed altri patogeni meno comuni, tra i quali un ruolo importante sembra giochino i virus sinciziali che, si ritiene, predispongano alla colonizzazione susseguente da parte di *P. aeruginosa*. Risalgono alla fine degli anni '70 le prime segnalazioni, da parte di numerosi laboratori di Microbiologia che seguivano i pazienti affetti da FC, riguardanti l'isolamento di *Burkholderia cepacia*. Pochi anni dopo comparvero i primi lavori che descrivevano la cosiddetta sindrome da *B. cepacia*, una grave e progressiva compromissione respiratoria, accompagnata da batteriemia, che colpisce un'alta percentuale di tutti i pazienti infetti. Da allora, studi successivi hanno chiarito come *B. cepacia* sia trasmissibile tra pazienti con FC e per tale motivo, al fine di limitarne la diffusione, è stato introdotto il principio della segregazione dei pazienti, una misura estremamente dura e difficile da accettare da parte di questi. Nonostante i notevoli progressi compiuti nello studio di questo patogeno opportunistico, l'infezione da parte di *B. cepacia*, è da considerare estremamente rilevante per il peggioramento delle condizioni di salute che ne conseguono e sulle aspettative di vita dei pazienti affetti da FC. Considerato inoltre che *B. cepacia* è resistente alla gran parte degli antibiotici, appare chiaro come gran parte degli sforzi siano attualmente orientati principalmente verso la prevenzione dell'infezione, verso il miglioramento delle procedure per l'identificazione di questo microrganismo e per l'identificazione e la caratterizzazione dei fattori di virulenza prodotti da isolati clinici diversi. A causa della sua complessa tassonomia, *B. cepacia* rappresenta un problema complesso non solo per quanto riguarda la sua identificazione, ma anche per quel che riguarda lo studio della sua epidemiologia.

Lo scopo di questa relazione è quello di presentare uno schema dei metodi correntemente utilizzati per l'identificazione e la caratterizzazione molecolare dei microrganismi appartenenti al cosiddetto "*B. cepacia* complex".

STUDIO DELL'ORGANIZZAZIONE TRASCRIZIONALE E DELLA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELL'OPERONE *OSP*B-*APY* PRESENTE SUL PLASMIDE DI VIRULENZA DI *S.FLEXNERI* E DI *E.COLI* ENTEROINVASIVO.

D. Santapaola¹, M. Casalino², A. Petrucca³, R. Piccolomini⁴, A. Calconi⁵, C. Zagaglia¹, F. Berlutti¹, B. Colonna⁵, e M. Nicoletti⁴.
¹Dip. di Scienze di Sanità Pubblica, Sezione di Microbiologia, e ⁵Dip. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Sezione di Scienze Microbiologiche, Università di Roma "La Sapienza"; ²Dip. di Biologia, Università "Roma Tre" e ³Istituto Superiore di Sanità, Roma; e ⁴Dip. di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia, Università "G. D'Annunzio", Chieti.

Il gene *apy*, localizzato sul plasmide di virulenza (pINV) di ceppi virulenti di *Shigella flexneri* e di *Escherichia coli* enteroinvasivi (EIEC), codifica una apirasi (ATP-difosfoidrolasi) periplasmica. L'espressione di tale gene è regolata a livello trascrizionale dallo stesso sistema regolativo (H-NS, VirF e VirB) che controlla l'espressione dei geni di virulenza. Sebbene il gene *apy* sia co-regolato con i geni di virulenza, il suo ruolo nel meccanismo di patogenicità dei batteri enteroinvasivi non è stato ancora chiarito.

Al fine di caratterizzare l'organizzazione genetica e molecolare del gene *apy*, abbiamo clonato e sequenziato un frammento *Pst*I di 8,023 bp del pINV del ceppo EIEC HN280, contenente il gene *apy* ed i geni adiacenti. Il frammento *Pst*I mostra un'omologia del 99% rispetto alla regione corrispondente del pWR100, il pINV di *S.flexneri* M90T e contiene quattro geni. A monte di *apy*, è localizzato il gene *ospB*, che codifica una proteina secreta, la cui funzione è anch'essa ancora sconosciuta. L'analisi della sequenza, esperimenti di Northern blot, RT-PCR, primer extension e fusioni trascrizionali hanno dimostrato che *ospB* ed *apy* sono trascritti mediante un mRNA bicistronico, temperatura-regolato, di circa 2 kb, a partire da un promotore localizzato a monte di *ospB*. Il trascritto di 2 kb viene processato nella regione intercistronica, probabilmente dall'endoribonucleasi RNasi E, inducendo la formazione di un mRNA di circa 1 kb codificante *apy*. Il trascritto di 1 kb presenta una vita media circa 5,5 volte maggiore di quella del trascritto bicistronico di 2 kb. La diversa vita media dei trascritti indica un'espressione differenziale dei due geni dell'operone. Esperimenti di Northern blot hanno inoltre dimostrato che la trascrizione dell'operone bicistronico è influenzata dalla densità cellulare, essendo fortemente indotta quando HN280 entra in fase tarda-esponenziale o precoce-stazionaria.

IDENTIFICAZIONE E TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI ISOLATI CLINICI DI *BURKHOLDERIA CEPACIA* PROVENIENTI DA PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA.

M. Nicoletti¹, P. Cipriani², P. Valenti³, S. Quattrucci⁴, R. Sessa², e M. Del Piano².

²Dip. Di Scienze di Sanità Pubblica e ⁴Ist. Di Clinica Pediatrica Università "La Sapienza", Roma, ¹Dip. Di Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti, e ³Dip. Di Medicina Sperimentale, II Università, Napoli.

RIASSUNTO

In questo studio abbiamo effettuato la caratterizzazione di 47 isolati clinici, presuntivamente identificati come *Burkholderia cepacia* tramite isolamento su terreno selettivo BCSA ed identificazione mediante il sistema API 20NE, isolati da 19 pazienti affetti da fibrosi cistica afferenti al Centro Regionale di Riferimento del Policlinico "Umberto I" di Roma. La caratterizzazione molecolare è stata condotta utilizzando le tecniche PCR-RFLP del gene 16S rDNA, e PCR-RFLP e PCR genomovar-specifica del gene *recA* al fine di determinare l'appartenenza degli isolati analizzati al gruppo "*B.cepacia* complex", ed identificare il genomovar di appartenenza. I risultati ottenuti indicano che la maggioranza degli isolati esaminati (43 dei 47) appartengono al "*B.cepacia* complex". In particolare, 28 dei 47 analizzati appartengono al genomovar III (precisamente 20 al III-A ed 8 al III-B). Dei rimanenti, 6 appartengono al genomovar I, 2 sono *B.stabilis*, 1 *B.multivorans*, e 6 non sono caratterizzabili con le tecniche utilizzate per l'identificazione dei 7 genomovar descritti. Quattro isolati non appartengono a "*B.cepacia* complex" (3 *B.gladiosi* ed 1 non identificato).

La tipizzazione molecolare mediante RAPD degli isolati appartenenti a "*B.cepacia* complex" ha mostrato l'esistenza di isolati epidemiologicamente correlati in pazienti diversi e, all'interno dei singoli genomovar, sono state identificate varianti che probabilmente indicano una origine epidemiologica diversa. Infine abbiamo identificato isolati che presentano un genomovar non descritto in letteratura e che quindi potrebbero costituire una nuova variante all'interno del cosiddetto "*B.cepacia* complex".

L'INFEZIONE IN VITRO DA *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* INIBISCE L'APOPTOSI DI CELLULE THP-1

A.Rizzo, M.R.Sanges, D.Vita, C.Romano Carratelli

Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli - P.zza S.Andrea delle Dame Napoli

La *Chlamydia pneumoniae* è un parassita intracellulare obbligato agente eziologico di infezioni dell'apparato respiratorio, di recente, associata a processi infiammatori che si sviluppano nell'arteriosclerosi. Questi batteri invadono preferibilmente i fagociti mononucleati, svolgendo un ruolo importante nel trasporto dei batteri nelle varie parti dell'organismo. Nel presente lavoro abbiamo studiato *in vitro* se l'infezione da *C. pneumoniae* in cellule THP-1 determinava modificazione (induzione o prevenzione) dell'apoptosi della cellula ospite. Si è dimostrato che durante la complessa interazione tra l'agente infettante e l'organismo ospite, il patogeno può interferire con la morte cellulare programmata (PCD) a proprio beneficio; infatti la *C.pneumoniae* inibiva l'apoptosi delle cellule THP-1 e la protezione dall'apoptosi era dipendente dalla dose infettante e dal tempo di incubazione. In particolare, le cellule THP-1 dopo 48h di infezione con *C. pneumoniae* ad un MOI di 30 presentavano una percentuale di cellule resistenti all'apoptosi del $85\% \pm 9$ rispetto al $50\% \pm 7$ delle cellule controllo, mentre ad un MOI di 10 il numero di cellule resistenti all'apoptosi risultava significativamente più basso ($68\% \pm 8$), ma sempre al di sopra dei valori delle cellule controllo. Per tempi di incubazione più lunghi non si dimostrava variazione significativa di resistenza all'apoptosi. Dal momento che l'infezione ad un più alto MOI spesso accelera la crescita intracellulare, è probabile che per lo sviluppo dell'attività antiapoptotica sia necessaria la crescita intracellulare della *Chlamydia*. La protezione dell'apoptosi dei monociti non era mediata dal lipopolisaccaride e richiedeva la sopravvivenza batterica nelle cellule infette. Infatti, le prove sperimentali ottenute dopo incubazione per 48h delle cellule THP-1 con *C.pneumoniae* inattivate al calore (90° per 30 min) dimostravano una percentuale di cellule resistenti all'apoptosi non significativa ($\text{MOI}=30, 58\% \pm 8$) rispetto alle cellule controllo ($50\% \pm 7$). In conclusione, i presenti dati dimostrano che la *C.pneumoniae* modula la risposta apoptotica della linea monocitaria THP-1 probabilmente a vantaggio del patogeno, prevenendo l'eliminazione della cellula ospite e creando le condizioni per una persistente infezione.

NUOVE METODOLOGIE PER LO STUDIO DEL MECCANISMO D'AZIONE DI FARMACI ANTIMALARICI

¹N. Basilico, ¹S. Parapini, ²D. Monti, ³P.Oliaro, ¹MG Neri e ¹D. Taramelli

¹Istituto di Microbiologia, ²Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale, CNR-CSSON, Università di Milano, ³WHO/TDR Geneva, CH.

Il meccanismo di azione degli antimalarici di tipo chinolinico, quali cloroquina (CQ), non è del tutto chiarito. Il bersaglio molecolare e' il metabolismo dell'eme, un processo unico e vitale dei plasmodi in fase intraeritrocitaria. Il parassita utilizza l'emoglobina come nutrimento e detossifica i gruppi eme cristallizzandoli ad emozoina o pigmento malarico. Un composto chimicamente identico detto beta-ematina (BH) e' sintetizzabile *in vitro* in ambiente acido. I farmaci chinolinici sono in grado di inibire la formazione di BH formando complessi con la porfirina e determinando un accumulo di eme o di complessi eme-farmaco tossici per il parassita. Non e' chiaro se la tossicità sia dovuta all'attività proossidante o all'effetto colloidale-osmotico dell'eme o dei complessi eme-farmaco.

Scopo del nostro lavoro e' stato quello di sviluppare nuove tecnologie per indagare il meccanismo d'azione dei farmaci chinolinici. Abbiamo esaminato: 1) l'inibizione della formazione di BH. A questo scopo e' stato messo a punto un micrometodo spettrofotometrico, chiamato BHIA (beta-haematin inhibitory activity) che quantifica la capacità inibente la formazione di BH di vari composti (Parapini S. et al.2000); 2) il ruolo della perossidazione lipidica nella morte del parassita. Questo aspetto e' stato indagato utilizzando differenti tensioni di ossigeno (1% e 20%) nei saggi di chemiosensibilità di *P.falciparum*. L'ossigeno e' infatti fondamentale in tutti i processi perossidativi a danno delle membrane. La crescita di *P.falciparum* e' stata valutata misurando la lattico deidrogenasi parassitaria.

I risultati indicano che CQ e altre chinoline, ma non primachina, inibiscono, in modo dose-dipendente, la formazione di BH. L'attività inibente correla con la capacità di accumulo del farmaco nei parassiti e con l'attività antimalarica. Il metodo BHIA e' utilizzabile per identificare potenziali antimalarici sia di neo sintesi che estratti di prodotti naturali. Inoltre, nei test di chemiosensibilità in atmosfere a diverse pO_2 , si è riscontrato che CQ e chinino, contrariamente all'atteso, sono più efficaci a bassa pO_2 ; amodiachina non e' influenzata dalla tensione di ossigeno. Ciò suggerisce, confermato anche dall'inefficacia degli antiossidanti (Vit E e Trolox) nel proteggere dalla tossicità delle chinoline, che la perossidazione lipidica non sia il principale meccanismo d'azione di questi farmaci e apre nuovi studi sulla loro reattività chimica.

METALLO-RESISTENZA IN DIVERSE SPECIE DI MICROORGANISMI AMBIENTALI E CLINICI

A. Deriu, L.A. Sechi, M.A. Zoroddu*, D. Usai, P. Molicotti, S. Zanetti

Dipartimento di Scienza Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università di Sassari

**Dipartimento di Chimica, Università di Sassari*

I problemi ambientali, nei loro molteplici aspetti, occupano un ruolo di rilievo nella nostra realtà. Lo sviluppo industriale ha certamente condotto ad un accrescimento della qualità della vita civile, ma come conseguenza negativa ha determinato un aumento dell'inquinamento ambientale. Tra gli inquinanti più pericolosi vi sono i metalli pesanti la cui concentrazione nel suolo, nell'acqua e nell'aria è in continuo aumento come conseguenza dell'attività antropica. La pericolosità di tali composti è dovuta al fatto che essi non sono biodegradabili, per cui persistono e si diffondono nell'ambiente; sono liposolubili, quindi tendono ad accumularsi nei tessuti adiposi e, attraverso la catena alimentare, vengono concentrati negli organismi superiori fino ad arrivare all'uomo; tali composti esercitano sia tossicità acuta che cronica sugli organismi viventi. Per cui risulta importante eseguire un costante monitoraggio dei metalli pesanti al fine della tutela ambientale e della salute pubblica.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'attività inibitoria di alcuni sali di metalli pesanti, quali rame, cadmio, nichel, piombo e mercurio su diverse specie microbiche di origine ambientale e clinica.

I risultati preliminari della ricerca hanno rilevato una elevata sensibilità dei microrganismi testati agli ioni del mercurio, mentre hanno mostrato notevole resistenza agli altri ioni metallici, senza alcuna differenza tra batteri gram-negativi e batteri gram-positivi. Inoltre la resistenza ai metalli pesanti delle specie oggetto di studio, sembra essere associata ad una antibiotico-resistenza prettamente plasmidica.

STUDIO DEI MECCANISMI DI VIRULENZA IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX IN MACROFAGI.

Cinzia Pusceddu, Giovanni Delogu, *Giovanni Fadda, Stefania Zanetti

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

**Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.*

La tubercolosi rappresenta ancora oggi una delle principali malattie infettive sia per l'uomo che per gli animali, in particolar modo nei paesi in via di sviluppo. La tubercolosi è causata da *Mycobacterium tuberculosis* nell'uomo e da *M. bovis* nel bestiame e in molti animali selvatici. Le due specie di micobatteri sono strettamente correlate ed i meccanismi di patogenesi così come il decorso della malattia sono molto simili tra loro. E' opinione comune che una migliore comprensione del meccanismo di patogenicità ed in particolare l'identificazione dei fattori di virulenza ad esso associati, rappresenti una tappa fondamentale e forse obbligata verso lo sviluppo di nuovi e più efficaci strumenti di controllo della malattia. Sono molteplici i parametri che contribuiscono a definire la virulenza di un determinato agente infettivo e nel caso dei micobatteri, tali meccanismi sono ancora in gran parte sconosciuti. Scopo dello studio è riuscire ad identificare almeno alcuni fattori di virulenza.

Quantunque strettamente correlati tra loro, *M. bovis* e *M. tuberculosis* presentano diversi gradi di virulenza in alcuni modelli animali (topo e coniglio), e ceppi diversi delle suddette specie possono presentare a loro volta livelli diversi di virulenza. Una valutazione comparativa di tali ceppi in modelli cellulari *in vitro* e successivamente in modelli animali in vivo può pertanto fornire un modello per l'individuazione e caratterizzazione di fattori di virulenza di *M. tuberculosis* complex.

In questo lavoro è stata valutata la capacità di ceppi clinici di invadere e moltiplicarsi all'interno di macrofagi rispetto ad alcuni ceppi di riferimento, allo scopo di effettuare un primo screening che permetta eventualmente di associare i diversi ceppi a pattern differenti.

Per gli esperimenti di infezione dei macrofagi sono stati utilizzati ceppi clinici di *M. bovis*, *M. tuberculosis* ed i ceppi di riferimento di *M. tuberculosis* H37Rv 102 e Erdman e il ceppo BCG Pasteur.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza delle importanti differenze nella capacità di crescita intracellulare tra i vari ceppi clinici. In particolare si è potuto dimostrare come i ceppi clinici mostrino in generale una più elevata virulenza *in vitro* rispetto ai ceppi di riferimento. Nonostante siano state osservate alcune differenze tra i ceppi clinici, non abbiamo registrato una maggiore capacità di crescita dei ceppi di *M. bovis* rispetto a quelli di *M. tuberculosis*.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI MICRORGANISMI PATOGENI IN ACQUE MARINE

W. Baffone*, E. Vittoria*, G.Lampis**, S. Laconi***, C. Pittau***, R. Pompei**.

*Università di Urbino, Ist. Scienze Tossicologiche, Igienistiche ed Ambientali, **Cattedra di Microbiologia, Università di Cagliari,

***Biotecne Cagliari

Campioni di acque marine, prelevate nell'Adriatico settentrionale (Cesenatico) e nel Tirreno meridionale (Cagliari), sono stati analizzati per la presenza di patogeni umani liberi o associati a zoo- e fito-plancton. La presente Unità Operativa ha curato in modo specifico l'isolamento e l'identificazione di Salmonella, Shigella e Campylobacter. La presenza di questi microrganismi è stata determinata sia con i comuni metodi colturali, che con sistemi molecolari, allo scopo di individuare anche l'eventuale presenza di forme vitali non coltivabili (VBNC) o di ceppi "vital-stressed". A tutt'oggi sono stati effettuati 5 prelievi nella costa adriatica e 3 nella costa sarda. I risultati provvisori sono riportati in tabella. Su 5 campioni prelevati in Adriatico non è stata rilevata la presenza di alcuno dei patogeni ricercati con metodi colturali, mentre in un caso l'indagine molecolare è risultata positiva per Campylobacter su un campione di plancton. Parimenti, nei campioni del mar Tirreno non sono stati isolati patogeni in coltura, ma anche in questa indagine un esame molecolare mediante PCR è risultato positivo per Campylobacter (*C. coli*, *C. upsaliensis*).

Tabella - Isolamento di Salmonella, Shigella e Campylobacter da acque marine prelevate nell'Adriatico centro-settentrionale e nel Tirreno meridionale

Campioni del Mar Adriatico			Campioni del Mar Tirreno		
data	Coltura	Es. molecolare	data	Coltura	Es. molecolare
23/4	Negativa	Negativo			
15/5	Negativa	<i>Campylobacter sp.</i>	4/5	Negativa	Negativa
20/6	Negativa	Negativa	21/6	Negativa	Negativa
17/7	Negativa	Negativa	18/7	Negativa	<i>Campylobacter sp.</i>
21/8	Negativa	Negativa			

I campioni risultati positivi sono stati sottoposti ad ulteriori analisi, colturali e molecolari, per determinare la presenza di ceppi VBNC o "vital-stressed". Si può concludere, anche se in via preliminare, che i Campylobacter possono trovarsi con una certa frequenza in ambiente marino, anche associati a forme di plancton e che la loro presenza è difficilmente valutabile con metodi colturali, ma più facilmente evidenziabile con tecniche di PCR.

I dati ottenuti permettono inoltre di ipotizzare la presenza di forme VBNC anche nelle specie di Campylobacter presenti in acque di mare.

Progetto eseguito con finanziamenti MIUR, PRIN 2000, e con la collaborazione di Biotecne, Cagliari.

CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DI UNA PROTEINA DELLA FAMIGLIA PE_PGRS DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

Giovanni Delogu, [§]Michael J. Brennan, Cinzia Pusceddu, ^{*}Giovanni Fadda, Stefania Zanetti.

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari. [§]Center for Biologics Evaluation and Research, FDA, Bethesda, MD (USA). ^{*}Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Negli ultimi anni le informazioni ottenute a seguito del completamento della sequenza del nel genoma di *Mycobacterium tuberculosis* hanno stimolato importanti ed originali ricerche che hanno consentito di capire importanti aspetti della biologia del bacillo, spesso ribaltando tesi che sembravano consolidate da decenni. Tra le informazioni più importanti e per certi versi sorprendenti, vanno annoverate l'individuazione di tre famiglie di proteine denominate PE, PE_PGRS e PPE, di cui sono stati individuati 38, 61 e 41 geni, rispettivamente. Quantunque tali proteine occupino circa il 5% della capacità codificante del batterio, siano altamente conservate, e siano state individuate soltanto in specie di micobatteri patogeni per l'uomo o altri mammiferi, ad oggi non si hanno dati sperimentali che aiutino a capire quale sia o possa essere la loro funzione. Nei nostri studi, un gene della famiglia PE (Rv1818c) è stato scelto come prototipo per lo studio di tale famiglia di proteine. Il gene Rv1818c, e la sua porzione PE, sono stati clonati in diversi plasmidi per l'espressione della proteina ricombinante in *Escherichia coli*, vaccini a DNA e plasmidi per micobatteri. I risultati ottenuti utilizzando diversi approcci sperimentali hanno consentito di dimostrare per la prima volta che le proteine PE_PGRS sono espresse durante l'infezione e che esse giocano un ruolo importante nell'immunologia dell'infezione. Inoltre, studi in cui il gene o parte di esso, veniva over-espresso in ceppi di micobatteri hanno fornito numerose informazioni sulla localizzazione delle proteine nella cellula batterica e sul loro ruolo funzionale.

PRESENZA DI HPV-DNA IN LESIONI MUCOSALI ORALI

Lama A¹, Giovannelli L¹, Campisi G², Ammatuna P¹.

¹Dip. Igiene e Microbiologia, ²Dip. Di Scienze Stomatologiche, Università di Palermo.

Nell'ultimo decennio la presenza del papillomavirus umano (HPV) è stata frequentemente riscontrata in lesioni orali potenzialmente maligne e maligne, ed è quindi stato ipotizzato un possibile ruolo dell' HPV come cofattore nella cancerogenesi orale. Nel nostro studio abbiamo ricercato la presenza di HPV -DNA in campioni di scraping orali da 132 pazienti [13 con carcinoma squamoso (OSCC), 25 con leukoplakia (OL), 34 con lichen planus (OLP), 11 con papilloma (OP), 26 con stomatite aftosa ricorrente (RAS), 23 con lesioni erosive -ulcerative benigne (EUL), di probabile origine traumatica] e da 90 soggetti controllo sani, senza segni clinici di lesioni orali. La presenza di HPV -DNA è stata ricercata mediante reazione di nested PCR e il genotipo virale è stato determinato mediante sequenziamento diretto dei prodotti di PCR. L'infezione da HPV è stata diagnosticata significativamente ($p < 0.0001$) più spesso in pazienti con lesioni orali che in soggetti controllo (34.8% vs 5.5%; OR=9.09; 95%CI: 3.44-23.9). La prevalenza di HPV-DNA era maggiore in casi di OP (82%) e OSCC (61.5%), mentre non era diversa tra casi di OL (28%), OLP (26.5%), RAS (23%) ed EUL (30.4%). Anche se la presenza di HPV in casi di OL ed OLP, considerati insieme come lesioni potenzialmente maligne (27.1%), non differiva molto da quella riscontrata in casi di RAS ed EUL, raggruppati come lesioni benigne (26.5%), solo il rischio di infezioni potenzialmente maligne associato con HPV (OR=14.5) è risultato statisticamente significativo (95% CI= 1.84-114.6). Mediante sequenziamento il genotipo HPV-18 è stato riscontrato nel 76.4% dei pazienti (senza alcuna associazione con uno specifico tipo di lesione) e nell' 80% dei controlli. L'analisi dei fattori di rischio per l'acquisizione dell'HPV ha evidenziato come l'infezione da HPV dipendeva dall'età (il rischio aumentava circa 3 volte per ogni incremento unitario dell'età) e dal fumo (aumento di 4.5 volte per i fumatori e circa 3 volte per gli ex-fumatori, rispetto ai non fumatori). La presenza di lesioni nel cavo orale determinava un aumento del rischio di infezione da HPV; in particolare, la presenza di lesioni benigne aumentava di circa 3 volte il rischio di infezione da HPV, evidenziando che qualunque distruzione dell'epitelio superficiale della mucosa orale per se può essere considerata come fattore di rischio per l'acquisizione di infezione orale da HPV.

ATTIVITA' IN VITRO DI DUE NUOVI ANTIBIOTICI SU ENTEROCOCCHI CON DIVERSA SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI GLICOPEPTIDICI ISOLATI NEL VENETO

Caterina Boldrin, Serena Amato, Lucio Cirelli,* Tiziana Tommasini,^o Carmen Ramon, Anna Grossato

Dipartimento di Istologia, Microbiologia, Biotecnologie Mediche- Università degli Studi di Padova Istituto Zooprofilattico delle Tre Venezie* Laboratorio di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova^o

La glicopeptido-resistenza negli enterococchi è ormai un problema emergente anche in Italia poiché gli isolamenti di ceppi resistenti ai glicopeptidici, vancomicina e teicoplanina (GRE), vanno aumentando negli ambienti clinici e sono ancora numerosi, anche se in misura limitata rispetto al passato dopo la messa al bando dell'avoparcina, quelli di origine animale, potenziale fonte di contaminazione per l'uomo attraverso la catena alimentare.

Nel presente lavoro sono state esaminate le attività *in vitro* di due farmaci, entrambi concessi in sperimentazione dalle ditte produttrici: LY333328 (Eli Lilly), un nuovo glicopeptide semisintetico e Linezolid (Pharmacia & Upjohn), un oxazolidinone, inibitore della sintesi proteica. Le MIC, allestite con la tecnica delle microdiluizioni, sono state eseguite su 300 ceppi di enterococchi comprendenti 50 ceppi GRE di cui 20 di origine umana (19 *E. faecium*, 1 *E. faecalis*) e 30 di origine animale (19 *E. faecium* e 6 *E. durans*). Detti ceppi sono risultati tutti portatori del gene *vanA* al saggio di PCR. Essi presentavano un profilo di resistenza elevato nei riguardi della maggior parte dei farmaci tradizionali: gentamicina (con il 94.8% dei ceppi umani e il 73.3% di quelli animali, resistenti), cloramfenicolo (con il 78,9% dei ceppi umani resistenti), ampicillina (con l'84,2% dei ceppi umani e il 77% di quelli animali, resistenti).

I due nuovi farmaci sono risultati efficaci su tutti i ceppi saggiati: le MIC di LY333328 erano comprese tra 0,125-2 ug/ml per i ceppi non-GRE mentre quelle dei ceppi GRE erano distribuite nell'intervallo 0,25-2 ug/ml per i ceppi umani (MIC₅₀ = 1ug/ml) e 0,5-8 ug/ml per quelli animali (MIC₅₀ = 4 ug/ml). Le MIC di Linezolid dei ceppi non-GRE erano talvolta superiori a quelle dei ceppi GRE, come osservato anche da altri autori, essendo comprese tra 4-8 ug/ml mentre quelle dei GRE risultavano comprese tra 2-8 ug/ml (MIC₅₀ = 2ug/ml per i ceppi umani e MIC₅₀ = 4 ug/ml quelli animali).

INFEZIONE DA POLIOMAVIRUS UMANO BK (BKV) NEI TRAPIANTATI DI RENE

Merlino C., Bergallo M., Fumagalli M., Sinesi F., Bollero C., Cavallo R.

Dipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia, Servizio Convenzionato di Virologia, Università degli Studi di Torino.

In numerosi studi è stata riportata una correlazione tra il BKV e la nefrite interstiziale nei portatori di trapianto renale, in cui il trattamento immunodepressivo sembra indurre, o almeno permettere la riattivazione del virus.

Nel presente lavoro abbiamo valutato la presenza del BKV-DNA mediante nested-PCR nelle urine e nel siero di 35 pazienti portatori di trapianto renale in relazione al tipo di trattamento immunodepressivo adottato ed ai livelli di funzionalità renale. Il genoma virale è stato dimostrato nelle urine del 65,7% dei pazienti studiati. L'8,7% di questi pazienti positivi per il BKV-DNA nelle urine presentava il genoma virale anche nel siero. Per quanto riguarda i protocolli immunodepressivi, i pazienti da noi studiati per l'80% erano sottoposti a trattamento che comprendeva l'FK506 e/o il micofenolato-mofetile (MMF), mentre solamente il 20% era in trattamento che comprendeva la CyA. Il BKV-DNA è stato dimostrato nelle urine del 64,3% dei pazienti in FK506 e/o MMF e nel 71,4% dei pazienti in CyA. Dei 2 pazienti positivi per BKV-DNA anche nel siero, uno era in trattamento con FK506, MMF e P, e l'altro con CyA e P. Questi dati, per quanto non statisticamente significativi, dato il non omogeneo campionamento nei due gruppi di trattamento, sembrano non indicare una correlazione tra il tipo di trattamento immunodepressivo e la dimostrazione del BKV. Dal punto di vista della funzionalità renale, il 91,3% dei pazienti con viruria presentava valori di creatinina sierica > di 2 mg/dl (con valori compresi tra 2,2 e 9,2 mg/dl), ma solo in 3 casi (13%) è stato dimostrato danno interstiziale alla biopsia renale. In particolare, solamente 1 di questi 3 pazienti era positivo per BKV-DNA sia nelle urine che nel siero. Anche in letteratura la correlazione tra l'escrezione del virus nelle urine, la sua dimostrazione nel sangue periferico, e la nefrite interstiziale non è stata chiarita; la nested-PCR è sicuramente un valido strumento diagnostico, specifico e sensibile per valutare la presenza del virus nelle urine e per valutare l'eventuale diffusione sistemica determinandone la presenza nel siero. Sono comunque necessari ulteriori studi, ed il monitoraggio mediante PCR quantitativa, che permette di valutare l'espansione virale in riferimento ai livelli basali propri di ogni singolo paziente, sarebbe il metodo migliore per seguire l'andamento dell'infezione da BKV e la sua implicazione nell'insorgenza di nefropatie nei portatori di trapianto renale.

LA SIMBIOSI TRA *TRICHOMONAS VAGINALIS* E *MYCOPLASMA HOMINIS*: LOCALIZZAZIONE E REPLICAZIONE INTRACELLULARE DELLE CELLULE BATTERICHE.

Daniele Dessì¹, Paola Rappelli¹, Giuseppe Delogu¹, Maria Filippa Addis¹, Maria Antonietta Cuccuru¹, Eleonora Emonte¹, Laura Mammarella¹, Giovanna Sanciù¹, Gunna Christiansen², Pier Luigi Fiori¹.

¹*Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Sassari.*

²*Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Aarhus Universitet, Aarhus, Danmark.*

Recenti studi del nostro gruppo di ricerca hanno stabilito e descritto l'esistenza di una relazione simbiotica tra due microrganismi patogeni entrambi a trasmissione sessuale: *T. vaginalis*, un protozoo, e *M. hominis*, un procariote. Scopo di questo lavoro è quello di stabilire la localizzazione delle cellule batteriche rispetto a quelle di *T. vaginalis*. Prove sperimentali indirette (saggio di protezione dall'azione della gentamicina) e dirette (microscopia confocale a doppia fluorescenza) dimostrano come *M. hominis* possa avere una localizzazione sia intra- che extracellulare rispetto alle cellule protozoarie.

Successivi esperimenti hanno invece dimostrato che le cellule di *M. hominis* si replicano all'interno di *T. vaginalis*. L'inibizione selettiva dell'attività DNA-polimerasica eucariotica, effettuata in presenza di gentamicina, ha permesso di evidenziare in modo specifico la sintesi *de novo* di DNA da parte di *M. hominis* all'interno delle cellule protozoarie.

Questi risultati consentono di chiarire alcuni aspetti dell'interazione tra *M. hominis* e l'ospite umano. Difatti la localizzazione e la replicazione all'interno di *T. vaginalis* potrebbero consentire al batterio, in vivo, di evadere dai sistemi di riconoscimento della risposta immune dell'ospite. Inoltre, questa caratteristica potrebbe risultare in una protezione da un'eventuale terapia farmacologica diretta contro *M. hominis* stesso.

Come già ipotizzato per altri rapporti simbiotici tra protozoi e procarioti (per es. *Acanthamoeba* e *Legionella pneumophila*), i meccanismi che regolano la simbiosi stessa potrebbero avere una forte influenza sulla patogenicità di uno o entrambi i microrganismi. La capacità di *M. hominis* di crescere all'interno delle cellule protozoarie potrebbe fornire al batterio stesso i meccanismi necessari per la sopravvivenza e la crescita durante l'infezione dell'ospite umano. Ulteriori studi in questa direzione sono richiesti per gettare luce su questi fenomeni.

VALUTAZIONE DEL SISTEMA AUTOMATICO BACTEC MYCOBACTERIA GROWTH INDICATOR TUBE (MGIT 960) PER IL SAGGIO DELLA SENSIBILITÀ AI FARMACI DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Fausta Ardito, Brunella Posteraro, Maurizio Sanguinetti, Stefania Zanetti, Giovanni Fadda

Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma

La validità del sistema BACTEC MGIT 960, versione automatica del ben noto Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) per il saggio della sensibilità ai farmaci di *Mycobacterium tuberculosis* veniva valutata su 78 ceppi clinici. Rifampicina (RMP), isoniazide (INH), streptomina (SM) e etambutolo (EMB) erano saggiati alle seguenti concentrazioni: 1.0 µg/ml per RMP, 0.1 e 0.4 µg/ml per INH, 1.0 e 4.0 µg/ml per SM, 5.0 e 7.5 per EMB. I risultati erano comparati con quelli ottenuti con il sistema radiometrico BACTEC 460 TB. Per quanto riguarda la riproducibilità del BACTEC MGIT 960, si osservava un accordo del 99.5% tra i test ripetuti per tutti e quattro i farmaci. Nel saggio della sensibilità dei ceppi clinici, un eccellente accordo era anche osservato tra i due sistemi; soltanto 9 sono state le discordanze, che riguardavano tre ceppi, risultati resistenti con il BACTEC MGIT 960 e sensibili con il BACTEC 460 TB a SM 4.0 µg/ml, INH 0.1 µg/ml, ed EMB 5.0 µg/ml (1 ceppo), e a SM 1.0 µg/ml, INH 0.4 µg/ml ed EMB 5.0 µg/ml (2 ceppi). Quando i tre ceppi sono stati saggiati mediante il metodo proporzionale su LJ, 5 risultati si accordavano con il BACTEC MGIT 960, e i rimanenti 4 con il BACTEC 460 TB. Studi molecolari sono stati anche effettuati sui tre ceppi con risultati discordanti. I tempi per l'ottenimento dei risultati erano comparabili (7.9 giorni con il MGIT 960 e 7.3 giorni con il 460 TB). I risultati di questo studio dimostrano che il BACTEC MGIT 960 può essere considerato una valida alternativa al sistema radiometrico per il saggio della sensibilità ai farmaci di *M. tuberculosis*.

IDENTIFICAZIONE DEI GENI TEM-1 DERIVATI CORRELATI CON IL FENOTIPO ESBL MEDIANTE UN METODO MOLECOLARE BASATO SUL SAGGIO LIPA

Lucio Romano, Maurizio Sanguinetti, Teresa Spanu, Brunella Posteraro, Alessia Siddu, Giovanni Fadda

Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma

L'incidenza di infezioni nosocomiali causate da *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* e altri membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* produttori di β-lattamasi a spettro esteso in grado di idrolizzare cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, ed aztreonam è in notevole incremento; ciò rende significativi gli sforzi compiuti dai microbiologi clinici nello sviluppo di nuovi metodi in grado di identificare in maniera affidabile gli enzimi ESBL in questi due generi molto comuni di batteri gram-negativi. È noto che i geni *TEM-1* e *SHV-1* che codificano per tali β-lattamasi vanno incontro a mutazioni spontanee che danno origine a nuovi enzimi tipo TEM e SHV, che quindi differiscono da quelli parentali per poche sostituzioni aminoacidiche. Attualmente sono stati descritti molti tipi di ESBL (da TEM-2 a TEM-93, e da SHV-2 a SHV-27), ognuno dei quali risulta associato con un differente profilo di sensibilità ai farmaci *in vitro*. Un saggio molecolare basato sulla tecnologia LIPA è stato da noi ideato per identificare idealmente tutti i geni mutati che codificano per gli enzimi tipo TEM nei generi di *Enterobacteriaceae* clinicamente importanti. Sono stati quindi disegnati tre set di primer, per amplificare il gene *TEM* in tre frammenti, e 14 sonde, comprendenti i codoni soggetti a mutazione correlata con il fenotipo ESBL. Le sonde sono state distribuite su tre strisce di nylon ciascuna da ibridare con un singolo amplicone. Se un ceppo possiede un gene *TEM* mutato nessun ibrido è rilevabile in corrispondenza della sonda specifica per il codone in cui si è verificata la mutazione. Allo scopo di valutare il metodo, 10 geni *TEM* provenienti da 10 ceppi, precedentemente caratterizzati come produttori di ESBL mediante test fenotipici e molecolari, sono stati clonati e sequenziati; quindi analizzati mediante il saggio LIPA. I risultati ottenuti sono stati perfettamente coincidenti con quelli attesi, dimostrando che tale metodo può essere validamente adoperato nella diagnostica delle resistenze.

CLONAGGIO ED ESPRESSIONE DEL GENE DELLA SUPEROSSIDO DISMUTASI CU, ZN (*CNSOD1*) DA UN CEPPO DI *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* RESISTENTE AL FLUCONAZOLO

Stefania Boccia, Brunella Posteraro, Maurizio Sanguinetti, Marilena La Sorda, Lucio Romano, Giovanni Fadda
Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma

La superossido dismutasi Cu,Zn (SOD) di *Cryptococcus neoformans*, che copre il 90% dell'attività SOD della cellula, sembra rivestire un importante ruolo nella risposta protettiva di tale lievito contro il danno ossidativo, principalmente attraverso la rimozione di O₂^{·-}. Una riduzione significativa nel killing di *C. neoformans* da parte dei leucociti polimorfonucleati mediante l'aggiunta esogena di SOD è un'ulteriore prova del ruolo protettivo svolto dall'enzima. Recentemente, il gene che codifica per la SOD, *CnSOD1*, è stato caratterizzato a livello molecolare e strutturale a partire da tre varietà di *C. neoformans* ed è stata effettuata un'analisi filogenetica del gene (Chaturvedi et al., Gene, 2001). Tuttavia, il ruolo della SOD Cu,Zn nella patogenesi di *C. neoformans* necessita di essere approfondito. In uno studio sui meccanismi di resistenza agli azoli in *C. neoformans*, da noi condotto attraverso la strategia della "cDNA library subtraction", abbiamo identificato un clone di cDNA che era maggiormente espresso nel ceppo di *C. neoformans* resistente al fluconazolo rispetto a quello parentale sensibile. Tale clone era per l'appunto omologo al gene *CnSOD1*. Per l'isolamento dell'intero gene, una "library" genomica di *C. neoformans* è stata screenata utilizzando come sonda il suddetto clone di cDNA; nello stesso tempo, la tecnologia RACE è stata utilizzata per la generazione dell'intero cDNA. Quest'ultimo è stato sequenziato, così come il frammento fagico con il DNA genomico corrispondente. L'analisi comparativa delle sequenze ci permetteva di definire la struttura del gene *CnSOD1*. Inoltre, il cDNA è stato espresso in *Pichia pastoris* e la proteina prodotta è stata quindi identificata mediante analisi in immunoblotting. I nostri dati offrono la base per futuri studi sul ruolo della SOD Cu,Zn nella resistenza ai farmaci di *C. neoformans*.

ATTIVITÀ IN VIVO DI UN SOTTOPRODOTTO DELLA LAVORAZIONE DI *CITRUS BERGAMIA* RISSO & POITEAU SU *CANDIDA ALBICANS*.

F.C. Pizzimenti, V.Alonzo, C.Naccari, M.Giampà, C. De Domenico, M.R. Mondello
Dip. Farmaco-Biologico-Facoltà di Farmacia- Università di Messina

Nell'ambito della patologia da microrganismi opportunisti è sempre più frequente il riscontro di nuove condizioni di relativa debilità biologica che si aggiungono ad altre già note e frequenti.

Negli ultimi anni la patologia da *Candida albicans* ha avuto un incremento notevole, rivestendo un ruolo sempre più importante nel contesto clinico e terapeutico.

In lavori precedenti era stata già sperimentata l'attività antibatterica dei sottoprodotti provenienti dalla lavorazione del bergamotto (Peratoner)(Pizzimenti F.C. et al., 1998), la non mutagenicità e quindi la sua tollerabilità e la non tossicità in vitro su epidermide umana ricostituita (HRE, Hepiskin) (Tesi sperimentale 2000).

Nel presente lavoro, abbiamo voluto valutare l'attività antimicotica e la tollerabilità su animali da laboratorio, tramite applicazione cutanea del peratoner, dopo averne valutato la buona attività in vivo.

Gli animali infettati con *Candida albicans* sono stati trattati a vari tempi (24, 48 ore) con peratoner e su questi è stato effettuato un campionamento per verificare la carica microbica rispetto al tempo 0 di infezione.

Contemporaneamente sono stati effettuati dei punch per l'allestimento dei preparati morfologici.

Negli animali infetti e non trattati con peratoner si sono osservate infrazioni del derma con presenza di cellule infiltranti, mentre negli strati superficiali del foglietto epidermico che si distaccano dagli strati basali, si nota la presenza di cellule di *Candida albicans*. A 24 ore dal trattamento con peratoner gli strati epidermici sono ancora esigui nel numero, mentre nel derma gli elementi infiltranti sono presenti in minore quantità e si notano ammassi di cellule di *Candida* al di sopra dello strato corneo.

Dopo 48 ore di trattamento l'epidermide mostra gli strati in fase di proliferazione, mentre nel derma sono ancora osservabili elementi infiltranti. Dopo tale periodo e fino ad una settimana dal trattamento si osserva un totale recupero delle strutture cutanee.

Si potrebbe quindi ipotizzare che i componenti presenti nel peratoner, con attività antiossidante nota, potrebbero interagire con la produzione di radicali liberi, migliorando la risposta infiammatoria ed impedire l'inasprimento del processo invasivo della *Candida* (Jones-Carson et al., 1995).

TIPIZZAZIONE DEI CLUSTER *VAN A* E *VAN C* E ANALISI DELLE SEQUENZE FIANCHEGGANTI IL CLUSTER *VAN A* IN UN CEPPLO DI *ENTEROCOCCUS GALLINARUM* ALTAMENTE RESISTENTE AI GLICOPEPTIDI

G. Foglia, P. Brega, P.E. Varaldo, F. Biavasco

Istituto di Microbiologia dell'Università di Ancona

In due isolati di *E. gallinarum*, provenienti dalla stessa emocoltura e appartenenti allo stesso ceppo, ma caratterizzati da un diverso livello di resistenza ai glicopeptidi, erano stati precedentemente individuati sia il determinante specie-specifico *vanC-1* sia il determinante acquisito *vanA*, ambedue localizzati a livello cromosomico. In questo lavoro i due isolati sono stati ulteriormente analizzati per l'organizzazione dei due cluster genici *vanA* e *vanC*, la loro localizzazione a livello cromosomico, e le sequenze fiancheggianti il cluster *vanA*.

L'organizzazione dei cluster *vanA* e *vanC* è stata analizzata mediante esperimenti di PCR (utilizzando coppie di primers specifiche per tutti i geni del Tn1546 e per i determinanti *vanC-1*, *vanXYc*, *vanT*, *vanRc* e *vanSc*), e long-PCR seguita da analisi di restrizione con opportuni enzimi. La loro localizzazione è stata determinata in seguito a digestione del DNA totale con *SmaI* o *SaII*, separazione dei frammenti mediante PFGE e successiva ibridazione con le sonde *vanA* o *vanC*. L'analisi delle sequenze fiancheggianti il cluster *vanA* è stata effettuata mediante PCR inversa e successivo sequenziamento. I risultati ottenuti non hanno evidenziato differenze nei due isolati. Il cluster *vanC* (localizzato a livello di un frammento *SmaI* di circa 28 kb) è risultato corrispondere perfettamente a quello descritto nel ceppo *E. gallinarum* BM4174. Il cluster *vanA* (localizzato a livello di un frammento *SmaI* di circa 60 kb e *SaII* di circa 20 kb) era portato da un elemento simile al Tn1546. Questo elemento corrispondeva nella regione centrale *orf2-vanX* a quello prototipo, ma era deletato a tutte e due le estremità (a monte della seconda metà di *orf1* e a valle della regione intergenica *vanXY*) e fiancheggiato sia a destra che a sinistra da una copia (con orientamento opposto) della sequenza di inserzione IS1216V.

Non essendo stato possibile evidenziare alcuna differenza a livello genotipico, è logico ipotizzare che i diversi livelli di resistenza espressi dai due isolati siano dovuti a differenti meccanismi di modulazione dell'espressione genica o a interazioni post-trascrizionali. I risultati ottenuti mettono in evidenza da un lato l'importanza del trasferimento genetico orizzontale nell'acquisizione di nuovi determinanti di resistenza e dall'altro il ruolo della sequenza di inserzione IS1216V nei meccanismi di ricombinazione che coinvolgono i determinanti di glicopeptidasi resistenza

“EPITOPE-TAGGING” DI GENI CROMOSOMALI IN *SALMONELLA*

Uzzau S¹, Delogu G.¹, Figueroa-Bossi N², Bossi L², Rubino S¹

¹Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, 07100 Sassari.

²Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, France.

L'accumulo delle sequenze genomiche ottenute da un crescente numero di microorganismi ha stimolato lo sviluppo di approcci post-genomici e ha modificato le metodiche genetiche classiche. Aniché ricercare ed identificare geni sulla base dei fenotipi di microorganismi mutanti, è divenuto molto comune partire dalle stesse sequenze geniche per poi studiarne le funzioni ed i meccanismi di regolazione attraverso le comuni tecniche di DNA ricombinante. In questo quadro, abbiamo sviluppato una semplice ed efficiente procedura per aggiungere brevi sequenze codificanti specifici epitopi (epitope tags) ad uno o più geni cromosomali di interesse. In questa metodica, un modulo di DNA che inizia con la sequenza che codifica per l'epitopo ed include un marker antibiotico di selezione, viene amplificato, mediante PCR, con primers che possiedono brevi estensioni al 5' (36 nt) omologhe all'estremità 3' del gene target ed alla regione immediatamente adiacente ad esso. L'amplificato viene introdotto, mediante elettroporazione, in un ceppo che esprime le funzioni *red* del fago Lambda, permettendo di ottenere trasformanti in cui il gene target è fuso con la sequenza che codifica per l'epitopo. La proteina che ne risulta possiede l'epitopo alla sua estremità COOH-terminale ed è può essere identificata mediante tecniche immunologiche standard.

In una prima applicazione della metodica, abbiamo inserito gli epitopi FLAG[®], 3xFLAG[®] e HA in vari geni di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, in particolare in geni profagici con caratteri di virulenza ipotetici o ben caratterizzati. Le proteine di fusione sono state analizzate in batteri coltivati in vitro, in modelli di infezione epiteliale e macrofagico e, infine, in tessuti di animali infettati. Il lavoro ha permesso di identificare nuovi loci profagici specificamente espressi dai batteri durante la loro crescita intracellulare. La procedura descritta è applicabile ad un'ampia varietà di gram-negativi e particolarmente efficace nello studio dei meccanismi molecolari di patogenicità microbica.

MICOSI OPPORTUNISTICHE IN AIDS: RUOLO DELL'INTERFERONE GAMMA NELLA RISOLUZIONE DELL' INFEZIONE MURINA DA *Penicillium marneffei*

F. Sisto^{a)}, A. Miluzio,^{a)} O. Leopardi^{b)}, M.G. Neri^{a)}, J.R. Boelaert^{c)} e D.Taramelli^{a)}

^{a)} Istituto di Microbiologia, Università di Milano, ^{b)} Divisione di Patologia, Ospedale Maggiore di Lodi, ^{c)} Unit of Renal Infectious Disease, Brugge, Belgio

Penicillium marneffei (Pm) è un fungo opportunisto, endemico nel SudEst asiatico, che causa gravi micosi nei pazienti con AIDS. È noto che i linfociti T e i macrofagi svolgono un'azione protettiva e fungicida in vivo ed in vitro, come precedentemente dimostrato (Taramelli et al. 2001). Non è conosciuto il ruolo svolto dalle citochine o dalle chemiochine nella risposta immune contro il Pm. Il nostro obiettivo è stato quello di sviluppare un modello di infezione in vivo con Pm, in topi Balb/c per valutare, tramite RT-PCR, il pattern di citochine, di chemiochine e dei loro recettori espressi nei tessuti infetti. L'infezione sub-letale (5×10^5 conidi/topo, i.v.) causa epato-splenomegalia con formazioni di granulomi. Il numero di UFC aumenta fino al giorno +7 dall'inoculo sia nella milza che nel fegato degli animali trattati. L'infezione poi regredisce velocemente nella milza e dopo 21 gg dall'inoculo, il fungo è completamente eliminato. Nel fegato invece l'infezione prosegue intensa per oltre due settimane per poi decrescere al giorno +42 e scomparire dopo il giorno +54. In parallelo, è stata riscontrata l'espressione di IL-12, IFN γ e iNOS, ma non di IL-4 e IL-10, nelle milze degli animali infetti nei primi 7 gg dall'infezione con una cinetica comparabile a quella osservata nelle UFC. Il picco di citochine nel fegato si presenta fra 7 e 14 giorni dopo l'infezione, ma i livelli si mantengono elevati più a lungo. L'IFN γ sembra avere un ruolo cruciale nella risoluzione dell'infezione: infatti topi Balb/c, IFN γ Ko inoculati con la stessa dose di conidi, sono morti 18 giorni dopo il trattamento, per micosi disseminata. Quando poi è stata valutata l'espressione delle chemiochine (MCP1, MIP1a e RANTES) e dei loro recettori, CCR1, CCR2 e CCR5, CCR3 e CCR4 negli organi infetti, si è osservato che l'espressione delle chemiochine e dei rispettivi recettori, segue la stessa cinetica dell'infezione. Questi dati indicano che in soggetti immunocompetenti l'infezione viene risolta grazie all'attivazione di una risposta immune cellulare di tipo Th1. Inoltre, vista l'importanza che le chemiochine ed i loro recettori rivestono nelle infezioni da HIV, è probabile che la co-infezione con Pm possa modificare anche il corso dell'infezione virale.

BRACHYSPIRA (SERPULINA) PILOSICOLI, AGENTE EZIOLOGICO DI SPIROCHETOSI INTESTINALE UMANA ED ANIMALE PER LA PRIMA VOLTA ISOLATA IN SUINI ALLEVATI IN ITALIA.

CALDERARO A., DETTORI G., RAGNI P., GUÉGAN R., PICCOLO G., ZUELLI C., CONTER M.¹, GIORDANO R., ARCANGELETTI M.C., MEDICI M.C., CHEZZI C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio - Sezione di Microbiologia; ¹Dipartimento di produzioni animali, biotecnologie veterinarie, qualità e sicurezza degli alimenti - Università degli Studi di Parma.

Il metodo di amplificazione genica e l'analisi dei frammenti di restrizione degli ampliconi (RFLP-PCR) sono stati vantaggiosamente utilizzati per identificare spirochete intestinali patogene isolate da pazienti con spirochetosi intestinale e da suini allevati in Italia, allo scopo di verificare, tra queste, la presenza di agenti di zoonosi. Il DNA estratto dalle spirochete studiate è stato sottoposto ad amplificazione genica (PCR) di una sequenza bersaglio di 558pb presente nel DNA 16S specifica del genere *Brachyspira* (*Serpulina*) e a successiva digestione enzimatica (RFLP) mediante 4 endonucleasi di restrizione (*Hinf*I, *Sau*3AI, *Mbo*II, e *Taq*I). Come atteso, dopo PCR è stata osservata una banda di 558pb corrispondente alla sequenza di DNA bersaglio ricercata, confermando che le spirochete studiate appartengono al genere *Brachyspira* (*Serpulina*). L'analisi mediante RFLP del prodotto amplificato ha dimostrato che, tra le 27 spirochete fin'ora analizzate, quelle isolate da pazienti con spirochetosi intestinale appartengono alla specie *B. (S.) pilosicoli*, e tra le 17 spirochete isolate da suini con dissenteria emorragica e spirochetosi intestinale, 4 ceppi appartengono alla specie *B. (S.) pilosicoli*, 12 alla specie *B. (S.) hyodysenteriae* e 1 alla specie *B. (S.) murdochii*. I risultati di questo studio dimostrano, per la prima volta in suini allevati in Italia, la presenza di *B. (S.) pilosicoli*, spirocheta a potenziale trasmissione zoonotica, agente eziologico di spirochetosi intestinale umana e animale.

VALUTAZIONE DI UNA DOPPIA REAZIONE POLIMERASICA A CATENA (NESTED-PCR) PER LA DIAGNOSI DI LABORATORIO DI LEPTOSPIROSI.

CALDERARO A, DETTORI G., RAGNI P., GUÉGAN R., PICCOLO G., ZUELLI C., CONTER M.¹, BOMMEZZADRI S., GIORDANO R., ARCANGELETTI M.C., MEDICI M.C., CHEZZI C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio - Sezione di Microbiologia; ¹Dipartimento di produzioni animali, biotecnologie veterinarie, qualità e sicurezza degli alimenti - Università degli Studi di Parma

E' stata messa a punto e sperimentalmente valutata una doppia reazione polimerasica a catena (nested-PCR) per la diagnosi di laboratorio di leptospirosi mediante la ricerca e amplificazione di una sequenza bersaglio di 289 bp presente nel DNA 16S delle leptospire. Il metodo è stato in primo luogo valutato su campioni di sangue e di urine sperimentalmente addizionati con diluizioni seriali di colture pure (contenenti inizialmente 10^7 - 10^8 cell/ml) di ceppi di leptospire patogene comparativamente analizzati con diluizioni seriali di colture pure (contenenti inizialmente 10^7 - 10^8 cell/ml) di leptospire patogene e non patogene, e successivamente applicato alla ricerca di leptospire nei campioni biologici (siero, sangue, urine) arrivati nel nostro laboratorio per sospetta leptospirosi. Uno specifico prodotto di amplificazione è stato osservato dopo elettroforesi in gel di agaroso del DNA sottoposto a PCR e ottenuto da tutte le colture pure e dai campioni simulati saggiati fino alla diluizione pari a N° 1-2 leptospire/ml. Riguardo ai campioni biologici, la nested-PCR ha consentito di rivelare la presenza di DNA di leptospire nel siero di due pazienti affetti da insufficienza epato-renale, uno dei quali è deceduto in seguito all'infezione: al contrario, i metodi tradizionali (indagini colturali e sierologiche) erano in questi casi negativi. I risultati ottenuti dimostrano che la nested-PCR è una indagine innovativa che può essere vantaggiosamente affiancata ai metodi tradizionali per la diagnosi di laboratorio di leptospirosi, nei confronti dei quali mostra maggiore sensibilità e specificità, notevole rapidità di esecuzione, ad un costo relativamente contenuto. Indirizzo completo dell'Autore che presenterà la Comunicazione Orale

SENSIBILITÀ IN VITRO AI FLUOROCHINOLONI DI *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ISOLATI DA PAZIENTI NEUTROPENICI

Di Bonaventura G.¹, D'Antonio D.², Nicoletti M.¹, Piccolomini R.¹

¹Dipartimento di Scienze Biomediche, Laboratorio di Microbiologia Clinica, Università "G. D'Annunzio", Chieti; ²Divisione di Ematologia ed Oncologia, Ospedale Civile, Pescara.

Background = Le infezioni da *Stenotrophomonas maltophilia* sono segnalate in costante aumento in ambiente nosocomiale, interessando prevalentemente pazienti immunocompromessi per malattie debilitanti o sottoposti a procedure chirurgiche. L'associazione trimethoprim-sulfametossazolo (SXT) ha rappresentato per lungo tempo il trattamento di elezione per l'infezione da *S. maltophilia*. Tuttavia, la tossicità del componente sulfonamide aggiunta al recente aumento di casi di SXT-resistenza rendono necessaria l'individuazione di una valida alternativa terapeutica. **Scopo dello studio** = Comparare l'attività *in vitro* di tre vecchi fluorochinoloni (ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina), due recenti fluorochinoloni (grepafloxacina, levofloxacina) e SXT nei confronti di *S. maltophilia* isolati da pazienti neutropenici affetti da ematopatie maligne. **Materiali e metodi** = Sono stati testati 92 ceppi consecutivi e non duplicati di *S. maltophilia* isolati da espettorato (58%), quindi da tampone faringeo (22%), da sangue (10%) e da urine (10%). Gli isolati batterici sono stati identificati come *S. maltophilia* attraverso il sistema API 20 NE (bioMérieux Italia SpA). La sensibilità a SXT, ciprofloxacina, ofloxacina e norfloxacina è stata determinata mediante diffusione da dischetto in terreno agarizzato. L'attività di grepafloxacina e levofloxacina è stata valutata mediante diluizione in agar, data la indisponibilità commerciale dei rispettivi dischi antibiotizzati. **Risultati** = L'attività *in vitro* dei fluorochinoloni e di SXT nei confronti di 92 isolati clinici di *S. maltophilia* è riassunta in tabella:

Antibiotici	% R	% S	% isolati SXT-R
Ciprofloxacina	71.7	28.3 *	39.1
Norfloxacina	87.0	13.0 *	34.8
Ofloxacina	50.0	50.0	30.4
Grepafloxacina	47.8	52.2	26.0
Levofloxacina	41.3	58.7	26.0
SXT	39.1	60.9	39.1

* $P < 0.05$ (χ^2 test), rispetto a SXT.

Conclusioni = Levofloxacina, grepafloxacina ed ofloxacina rappresentano – per l'attività *in vitro* e per le migliori proprietà farmacocinetiche e tossicologiche – una valida alternativa al SXT nella terapia delle infezioni da *S. maltophilia* in tutti i casi per i quali l'uso dei sulfamidici risulti essere controindicato.

THIOBACILLUS FERROOXIDANS, RESISTENZA AL RAME E AD ALTRI METALLI PESANTI: ACCRESCIMENTO ED EFFETTO DEL PREADATTAMENTO AL RAME, SINTESI E FOSFORILAZIONE PROTEICA.

¹Antonia Costacurta, ^{1,2,3}Teresa M Novo, ¹Alba C. da Silva ³Oswaldo Garcia Jr., and ¹Laura Ottoboni.

¹Centro di Biologia Molecolare e Ingegneria Genetica CBMEG/UNICAMP. ²Dipartimento di Genetica e Evoluzione IB/UNICAMP, 13083-970 Campinas-SP Brasile. ³Dipartimento di Biochimica dell' Istituto di Chimica di Araraquara, UNESP, 14800-900 Araraquara-SP, Brasile.

T.ferrooxidans è un batterio GM⁻ acidofilo e chemiolitotrofo, utilizzato nella biolisciviazione dei metalli. Nonostante *T.ferrooxidans* presenta una resistenza generalizzata ad alte concentrazioni di metalli, i meccanismi di questa resistenza sono, nella maggior parte dei casi, sconosciuti. Esperimenti di respirometria hanno dimostrato che l' "uptake" dell' ossigeno di *T.ferrooxidans* non è inibito in presenza di rame 0,2 M. Colture di *T.ferrooxidans* LR preadattate al rame e non preadattate sono state usate per esperimenti di accrescimento in presenza di cadmio, rame, nichel e zinco. L' accrescimento in presenza di rame è risultato più rapido per le colture preadattate al rame, al contrario, il preadattamento al rame, ha pregiudicato l' accrescimento batterico in presenza di alluminio, nichel, cadmio, manganese e zinco; le stesse colture hanno presentato una fase stazionaria di 190 ore prima di riprendere l' accrescimento in presenza di cadmio, nichel e zinco. Per indagare se vi fossero proteine indotte in presenza di metalli i "pattern" proteici di *T.ferrooxidans* LR sono stati analizzati tramite indagine proteomica, dopo aver coltivato i batteri in mezzo contenete 0,2 M di rame, oppure 0,6 M di cadmio, oppure 0,5 M di alluminio, oppure 0,8 M di magnesio. Le variazioni riscontrate nel "pattern" proteico sono diverse per ogni metallo, suggerendo la presenza di diversi meccanismi di resistenza specifici per ognuno di metalli impiegati. Specifiche proteine sono state indotte in presenza di rame (16, 28 e 42 kDa) e cadmio (66 kDa), mentre in presenza di tutti gli altri metalli pesanti testati si è osservata la repressione della sintesi di alcune proteine. L' induzione di proteine di *T.ferrooxidans* LR dopo accrescimento in presenza di rame è stata osservata nella frazione delle proteine di membrana e in quelle citosoliche, e si è riscontrato che il livello di fosforilazione proteica è aumentato in presenza di questo metallo.

Ausilio finanziario: CAPES, CNPq, FAPESP.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI STIPTI DI JC VIRUS AMPLIFICATI DA TUMORI CEREBRALI

¹Pagani E., ²Tarantini L., ¹Borghi E., ²Delbue S., ¹Mancuso R., ³Omodeo-Zorini E., ³Monga G., ⁴Car P.G., ³Boldorini R., ^{1,2}Ferrante P.

¹Laboratorio di Biologia, Fondazione Don C. Gnocchi ONLUS, IRCCS, Milano; ²Cattedra di Virologia, Dip. Scienze Precliniche, Università di Milano; ³Dip. Scienze Mediche, Università di Novara; ⁴Dip. Neurochirurgia, Ospedale della Carità, Novara, Italia.

La possibilità che il virus JC (JCV) possa essere coinvolto nell' eziopatogenesi dei tumori cerebrali umani è suggerita dalle recenti osservazioni del ritrovamento di DNA virale nei tessuti cerebrali tumorali e dalla dimostrata capacità di trasformazione neoplastica dell' antigene LT (*large T-antigen*), una proteina regolatoria virale in grado tra l' altro di legare e inattivare fattori oncosoppressori cellulari (p53 e pRb).

Allo scopo di contribuire a definire se e quale sia il ruolo preciso del JCV nello sviluppo delle neoplasie cerebrali, abbiamo ricercato il virus in campioni di tessuto tumorale ed abbiamo valutato la distribuzione tra gli stipti amplificati dei diversi genotipi e sottotipi di JCV ed il pattern dei riarrangiamenti della regione regolatoria (TCR), due fattori che sono stati suggeriti come possibili elementi condizionanti il neurotropismo e la neurovirulenza.

Mediante nested-PCR, *RFLP* e analisi della sequenza nucleotidica abbiamo perciò verificato la presenza di sequenze genomiche virali nel tessuto biotipico neoplastico fresco, nei linfomonociti purificati da sangue periferico e nel liquor (CSF) prelevati da 30 pazienti affetti da diversi isotipi di tumore cerebrale. Successivamente abbiamo condotto l' analisi della sequenza nucleotidica delle regioni che consentono la definizione del genotipo virale (VP1) e di quelle che sembrerebbero condizionarne il tropismo cellulare (TCR).

Il DNA di JCV è stato ritrovato nel 57.1% (8/14) dei casi di glioblastoma, nel 26.8% (2/7) dei meningiomi e nel 33.3% (1/3) degli astrocitomi. Inoltre, l' analisi di sequenza condotta a livello dell' estremità 5' della regione codificante per la proteina capsidica VP1 e della regione regolatoria ha dimostrato l' esclusiva presenza dei sottotipi 1a (quattro tessuti tumorali e un CSF) e 1b (tre tessuti tumorali e un CSF) e delle forme riarrangiate, di cui una di derivazione archetipale (un tessuto tumorale) e quattro *Mad-4* (tre tessuti tumorali e un liquor).

Nel loro complesso i risultati ottenuti confermano l' ipotesi che il JCV possa giocare un ruolo nel determinismo dei tumori cerebrali umani ed in particolare dei glioblastomi e sembrano indicare il JCV tipo 1, *strain Mad-4*, quale maggiormente coinvolto nel gruppo di tumori studiati.

STUDIO MOLECOLARE DI ALCUNI *HELICOBACTER PYLORI* CLARITROMICINA-RESISTENTI

Carla Fontana^{1,2*}, Marco Favaro³, Silvia Minelli², Anna Angela Criscuolo², Enrico Salvatore Pistoia^{1,2}, Francesca Capalbo², Daniele Marino^{1,2}, Oriana Cicchetti², Antonio Pietroiusti⁴, Alberto Galante⁴ and Cartesio Favalli^{1,2}.

^{1,4}Dip. di Med. Sperimentale e Sc. Bioch.- Dip. di Med. Interna- Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".- Via di Tor Vergata 135, 00133 Roma

²Laboratori di Microbiologia Clinica-Policlinico di Tor Vergata- Viale Oxford 81, 00133 Roma.

³Dip. di Biologia. Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" - Viale della Ricerca Scientifica, 00133 Roma

Il ruolo dell'*Helicobacter pylori* nelle patologie gastriche è ormai dimostrato. Dagli atti di: "National Institute of Health", "Maastricht Consensus", "Canadian Consensus", emergono le indicazioni relative al trattamento eradicante di questo microrganismo. La terapia più comune, allo stato attuale, prevede la combinazione di due antimicrobici (claritromicina ed amoxicillina o metronidazolo) in associazione con un inibitore di pompa protonica. Sebbene la resistenza di *H. pylori* agli antibiotici si registri assai di rado, l'eradicazione del microrganismo, presenta frequentemente delle difficoltà oggettive. Per esempio, la resistenza alla claritromicina è divenuta una tra le principali cause di insuccesso della terapia eradicante. Recenti lavori hanno dimostrato che la resistenza a questa molecola sembrerebbe dovuta ad una mutazione con transizione da A a G nella posizione 2142-2143bp del 23S RNAr. Lo studio dell'antibiotico resistenza è per garantire l'eradicazione di questo patogeno e si deve necessariamente fondare sull'impiego di metodi tradizionali, anche se è auspicabile procedere parallelamente all'impiego di tecniche di amplificazione molecolare. Queste ultime consentono, infatti, di esaminare la variabilità genetica di questo microrganismo che è associata alla diversa patogenicità degli isolati ed alla comparsa della resistenza agli antimicrobici. Scopo del nostro lavoro è stato quello, utilizzando una tecnica di amplificazione molecolare (PCR) che consentiva di ottenere ampliconi del 23S RNAr, di sequenziare le porzioni geniche in esame per individuare siti di modificazione, noti e non e di relazionarli alla resistenza mostrata. In totale sono state esaminate 230 biopsie gastriche, di cui 86 sono risultate positive per la presenza di *H. pylori*. Solo 12 fra gli isolati sono risultati claritromicina resistenti. L'analisi della sequenza nucleotidica dei ceppi resistenti, tuttavia, non mostrava nessuna delle mutazioni descritte in letteratura, mentre per 7 isolati (con una MIC= 1µg/ml) abbiamo messo in evidenza una mutazione mai descritta in precedenza, ossia una trasversione T su C alla posizione 2717.

STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTI-HIV DI AMPRENAVIR IN MACROFAGI UMANI.

S. Aquaro, R. Calì, T. Guenci, A. Modesti, CF. Perno.

Università di Tor Vergata, Roma.

Lo sviluppo di ceppi farmaco-resistenti di HIV-1 e la difficoltà ad inibire la replicazione virale in cellule lungo-sopravviventi (principalmente macrofagi tessutali e linfociti resting), rappresenta il maggiore ostacolo per la HAART. Nuovi composti antiretrovirali sono necessari per inibire con efficacia ed a lungo la replicazione di HIV-1 nei reservoirs che hanno il provirus integrato. Solo gli inibitori della proteasi posseggono, finora, questa peculiare caratteristica come dimostrano i test condotti su macrofagi umani (M/M) infettati da HIV-1. Nel presente studio è stata valutata l'efficacia antivirale di amprenavir in M/M e per comparazione in linfociti (PBL). I M/M sono stati ottenuti dal sangue di donatori volontari sani ed infettati con un ceppo M-tropico di HIV-1 (HIV-1_{Ba-L}). La stabilizzazione dell'infezione è stata determinata tramite dosaggio della produzione di HIV-p24 Ag rilasciato nel sovrantante delle colture di M/M, e successivamente i M/M sono stati trattati con amprenavir per valutare l'attività antivirale del farmaco in cellule cronicamente infettate. In un altro gruppo di esperimenti i M/M sono stati trattati con amprenavir prima dell'infezione, successivamente i dati sono stati comparati con quelli ottenuti nelle stesse condizioni sperimentali nei PBL (infezione acuta). Amprenavir ha mostrato di possedere una notevole efficacia sia nei M/M che nei PBL acutamente infettati, EC₅₀ 0.011µM e 0.021µM rispettivamente. La completa inibizione della replicazione virale di HIV-1 è stata raggiunta in entrambi i tipi cellulari, EC₉₉ di 0.2µM nei M/M e di 0.1µM nei PBL. Nei M/M cronicamente infettati amprenavir ha efficacemente inibito la replicazione virale ma a concentrazioni più elevate, EC₅₀ 0.72µM ed EC₉₀ 5µM. Inoltre, l'inibizione virale è stata mantenuta per un periodo molto lungo (2 settimane), ma alla sospensione del trattamento con amprenavir la produzione virale è immediatamente ripresa. Di grande interesse è il dato relativo alla capacità infettante del virus prodotto durante il trattamento che risulta essere diminuita di oltre un log. rispetto al controllo, anche dopo una settimana di sospensione del trattamento. La microscopia elettronica ha confermato questo dato evidenziando la presenza di numerose particelle virali immature e contenute in vacuoli nel citoplasma cellulare. I dati ottenuti suggeriscono che l'attività antivirale di amprenavir possa essere differente nei diversi distretti corporei, come ad esempio nel sistema nervoso centrale dove la quasi totalità delle cellule infettate da HIV-1 è costituita da M/M.

POTENTE EFFICACIA ANTI-HIV DI LD78 β , ISOFORMA DI MIP-1 α , IN MONOCITI E MACROFAGI UMANI.

S. Aquaro¹, P. Proost², J. Van Damme², E. De Clercq², CF. Perno¹, D. Schols², R. Calio¹.

¹Università di Roma Tor Vergata, Roma, Italia; ²Rega Institute, Leuven, Belgio.

Le CC-chemochine, RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β , sono naturali ligandi del recettore CCR5. MIP-1 α , nota anche come LD78 α , ha come isoforma LD78 β che differisce dalla prima soltanto in 3 amino acidi. LD78 β è molto più potente di LD78 α e di RANTES nell'induzione di flussi intracellulari di Ca²⁺ e nell'attivare la chemotassi tramite il legame con CCR5. Il CCR5 è costitutivamente espresso dai macrofagi umani (M/M) e rappresenta il più importante corecettore per i ceppi M-tropici di HIV-1. Nel presente studio è stata valutata, in comparazione con le altre chemochine, l'attività antivirale di LD78 β in M/M ed in monociti coltivati in presenza o meno di M-CSF.

A tal scopo le cellule sono state incubate con differenti concentrazioni delle chemochine ed infettate o con un ceppo M-tropico di HIV-1 di riferimento (HIV-1_{Ba-L}), oppure con un isolato clinico di HIV-1 che usa esclusivamente CCR5 per l'entrata (CI_{CCR5}). LD78 β alla concentrazione di 100 ng/ml ha completamente inibito la replicazione di HIV-1, mentre alla stessa concentrazione LD78 α non ha mostrato attività antivirale. La concentrazione efficace 50% (EC₅₀) di LD78 β è stata calcolata essere di 20 ng/ml. Inoltre, tramite citofluorimetria è stata descritta la riduzione drastica di particelle virali intracellulari di HIV-1 nei M/M. LD78 β è risultata essere la più potente delle CC-chemochine anche contro l'isolato clinico CI_{CCR5}. LD78 β (40 ng/ml) ha determinato un forte decremento dell'espressione di CCR5 sulla membrana cellulare dei M/M, tramite il legame e l'internalizzazione del recettore. Sebbene la stimolazione dei monociti con M-CSF abbia provocato una perdita di efficacia antivirale, anche in queste condizioni sperimentali LD78 β è comunque risultata essere la chemochina dotata di maggiore attività anti-HIV-1. Anche RANTES, precedentemente descritta come la chemochina più attiva nell'inibire i ceppi M-tropici, è risultata essere di gran lunga meno efficace di LD78 β nei M/M, ed addirittura non efficace nei monociti.

In conclusione, possiamo affermare che LD78 β è la più potente chemochina in grado di inibire la replicazione virale di ceppi M-tropici sia nei monociti che nei M/M.

ANALISI DELLA BIODIVERSITÀ DI *FRANKIA* (ACTINOMYCETALES) IN UNA STAZIONE NATURALE DI *ALNUS GLUTINOSA* E ISOLAMENTO GUIDATO DA PCR DI UNA NUOVA SPECIE GENOMICA

Marco Bosco, Erica Lumini e Riccardo Materassi

Dip. Biotecnologie Agrarie, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Firenze, Piazzale delle Cascine, 24 - 50144 Firenze, e-mail: marco.bosco@unifi.it

Gli attinomiceti azotofissatori del suolo appartenenti al genere *Frankia* instaurano simbiosi radicali con 24 generi di angiosperme legnose non-leguminose. Queste piante, già note per arricchire il suolo di sostanza organica ad alto tenore in azoto, riscuotono un crescente interesse nei sistemi agroforestali sostenibili dei climi temperati (1).

Poiché *Frankia* cresce molto lentamente *in vitro* e non è ancora possibile isolarla direttamente dal suolo, abbiamo anteposto l'approccio molecolare all'approccio colturale classico. Grazie all'esistenza di sequenze specifiche per *Frankia* a livello di genere nell'operone *nifHDK* e l'elevata variabilità dello spaziatore intergenico *nifDK*, dimostrate in precedenza (2), è stato possibile analizzare la biodiversità di *Frankia* in una stazione naturale di *Alnus glutinosa* applicando un protocollo *seminested* PCR-RFLP (3) agli acidi nucleici estratti direttamente dai noduli radicali e dal suolo (4).

Tra i tre profili messi in evidenza, uno risultava nuovo rispetto alla base di dati sulle specie esistenti (5), suggerendone l'appartenenza ad una nuova specie genomica di *Frankia*. Per confermare questa ipotesi abbiamo guidato l'isolamento mediante test PCR sistematici, che hanno permesso di verificare l'identità del microsimbionte durante tutte le fasi del protocollo.

Lo stesso approccio sta facilitando la valutazione dell'estensione della biodiversità di *Frankia* in altre stazioni forestali naturali e potrà servire per sfruttare queste conoscenze nelle applicazioni forestali e di ripristino ambientale, verificando l'impatto dei ceppi di introdotti sulla microflora autoctona.

Ricerca effettuata grazie al contributo del MiPAF (Progetto Panda - Microbiologia) e del C.N.R. (Progetto ECOMI).

1. Dommergues Y.R. and M. Bosco. 1998. In: Microbial interactions in agriculture and forestry. Subba Rao N.S. and Y.R. Dommergues (eds.). Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi. pp. 65-96.
2. Lumini E., and M. Bosco. 1999. Canadian Journal of Botany 77:1261-1269.
3. Lumini, E. and M. Bosco. 1996. Applied and Environmental Microbiology 62:3026-3029.
4. Picard C. *et al.* 1992. Applied and Environmental Microbiology 58:2717-2722.
5. Lumini *et al.* 1996. FEMS Microbiology Ecology 21:303-311.

EFFETTO DELLA CONCENTRAZIONE DI ANTIMONIO NEL SUOLO SULLA DIVERSITÀ DEI BATTERI PGPR ISOLABILI DALLA RIZOSFERA DI PIANTE IPERACCUMULATRICI DI METALLI PESANTI

C. Picard^{1,3}, A. Boscagli² e M. Bosco³

¹ ENSAIA - INRA, Nancy, Francia

² Dip. Scienze Ambientali - Università di Siena

³ Dip. Biotecnologie Agrarie - Università di Firenze

L'inquinamento dei suoli da metalli pesanti pone importanti problemi sanitari ed ambientali. L'antimonio (Sb), per esempio, può provocare danni al DNA e, a differenza degli inquinanti organici, non può essere degradato e persiste indefinitamente nel suolo. La fitoestrazione, ossia l'impiego di piante che iperaccumulano metalli pesanti nelle foglie, è una biotecnologia molto promettente la cui efficienza dipende, in gran parte, dalla proliferazione delle radici nel suolo.

In natura, numerosi generi batterici stimolano la crescita delle radici producendo auxine: questi vengono definiti "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (PGPR). La presente ricerca mira a selezionare i migliori genotipi batterici produttori di auxine (auxina⁺) da suoli contaminati con antimonio, da usare per inoculare le piante in applicazioni di fitoestrazione.

Per valutare l'effetto della concentrazione di antimonio sulla diversità dei rizobatteri auxina⁺ abbiamo confrontato le popolazioni isolabili dalla rizosfera di piante iperaccumulatrici che colonizzano naturalmente suoli minerari, prelevandole lungo un gradiente di contaminazione da antimonio. Sono state saggiate 4512 colonie batteriche mediante un test biochimico per l'auxina: 217 sono risultate positive. Poiché queste ultime derivano da tutti i campioni, si deduce che i batteri auxina⁺ possono colonizzare le radici delle piante iperaccumulatrici, qualsiasi sia la concentrazione di antimonio nel suolo. La capacità di colonizzazione varia, però, quantitativamente secondo il livello di contaminazione: gli isolati auxina⁺ rappresentano il 5% nei suoli poco o non contaminati, ma fino al 20% nei suoli molto contaminati.

La struttura di queste comunità di PGPR è stata caratterizzata mediante analisi molecolare (ARDRA) e statistica (AMOVA). I risultati indicano l'esistenza di una elevata diversità tra i ceppi auxina⁺, attribuibile per il 94% al livello di contaminazione del suolo. Inoltre, due genotipi risultano molto rappresentati, colonizzando le radici a qualunque concentrazione di antimonio. Alcuni ceppi di questi genotipi sono stati identificati tramite Biolog® come *Pseudomonas corrugata* e *P. putida*. Essi, se utilizzati come inoculanti, potrebbero migliorare l'efficienza dei processi di fitoestrazione per il risanamento dei suoli contaminati da antimonio.

Ricerca realizzata grazie ai contributi dell'OCSE (CP) e del MURST-Cofin99 (AB e MB).

EVOLUZIONE A LUNGO TERMINE IN VIVO DI RESIDUI AMINOACIDICI DELLA GLICOPROTEINA DI SUPERFICIE CHE GOVERNANO LA RESISTENZA GENERALIZZATA ALLA SIERONEUTRALIZZAZIONE IN UN LENTIVIRUS

Bendinelli Mauro, Pistello Mauro, Bonci Francesca, Gianecchini Simone, Presciuttini Silvano, Matteucci Donatella

Centro Retrovirus e Sezione Virologia, Dipartimento di Biomedicina, Università di Pisa

A differenza di molti ceppi adattati alla coltura in vitro, gli isolati di fresco isolamento di HIV e degli altri lentivirus sono altamente resistenti alla sieroneutralizzazione. Questa proprietà, ancora non chiara nelle sue basi molecolari e strutturali, è ritenuta importante per la persistenza dei lentivirus negli ospiti e per il mancato effetto protettivo di molti vaccini sperimentali. Abbiamo esaminato l'evoluzione a lungo termine in vivo di un ceppo di FIV marcatamente neutralizzazione-sensibile in quanto adattato in vitro. Il virus inoculato in sette gatti outbred specific-pathogen-free è rapidamente revertito a fenotipo neutralizzazione-resistente in tutti gli animali in periodi compresi tra 4 e 15 mesi dall'inoculo. Dal confronto delle sequenze della glicoproteina di superficie delle varianti cresciute in vivo e del ceppo parentale, è emersa una chiara correlazione tra tale reversione e comparsa di specifici aminoacidi nelle posizioni 481 e 557. In particolare, la posizione 481 è risultata coinvolta nella reversione a breve termine (entro 15-20 mesi dall'inoculo) mentre la 557 è risultata implicata nel mantenimento del fenotipo nel lungo periodo (36 mesi dall'inoculo). L'importanza delle due posizioni aminoacidiche nel controllo del fenotipo di neutralizzazione è stata poi dimostrata in modo inequivocabile mediante analisi della quasispecie degli isolati virali in vivo, caratterizzazione di cloni biologici, mutagenesi sito-specifica (Bendinelli et al., *J. Virol.* 2001) ed esperimenti di immunoselezione in vitro (Gianecchini et al., *J. Virol.* 2001). Proseguendo lo studio fino a 92 mesi dall'inoculo, abbiamo ora confermato il ruolo chiave delle due posizioni aminoacidiche nel controllo del fenotipo di neutralizzazione e dimostrato che, nel corso dell'infezione persistente in vivo, esse tendono a evolvere con una sequenza precisa e possono alternarsi nel determinismo della resistenza. Nel loro complesso questi risultati dimostrano che il fenotipo neutralizzazione-resistente è governato da un numero limitato di posizioni aminoacidiche della glicoproteina di superficie e che queste evolvono in modo ordinato. Ciò potrebbe avere implicazioni pratiche importanti nello sviluppo e nella formulazione di vaccini anti-lentivirus.

CARATTERIZZAZIONE DI ENTEROCOCCHI ISOLATI DA ENDOPROTESI BILIARI OCCLUSE

Bruna Facinelli¹, Cinzia Spinaci¹, Gloria Magi¹, Roberta Di Rosa², Gianfranco Donelli³.

¹Istituto di Microbiologia, Università di Ancona; ²Dipartimento di Medicina Clinica, Università La Sapienza, Roma; ³Istituto Superiore di Sanità, Roma.

La contaminazione batterica gioca un ruolo importante nell'occlusione delle endoprotesi biliari, un processo non ancora ben definito, caratterizzato dalla colonizzazione delle protesi con formazione di un biofilm all'interno del quale i batteri si moltiplicano protetti sia dalle difese dell'ospite che dall'azione degli antibiotici. Tra i batteri responsabili prevalgono i gram + e tra questi gli enterococchi, soprattutto *E. faecalis* ed *E. faecium*. È noto che i plasmidi feromono-sensibili degli enterococchi codificano per adesine (sostanze di aggregazione, AS) espresse in risposta allo stimolo da parte di feromoni sessuali specifici prodotti da ceppi privi di plasmidi. Le AS conferiscono agli enterococchi una elevata capacità adesiva che, oltre a favorire la coniugazione, aumenta l'adesione alle superfici dell'ospite. In questo studio, abbiamo analizzato contenuto plasmidico, risposta a feromoni sessuali, presenza di geni per AS e capacità adesiva di 19 ceppi di enterococco (12 *E. faecalis* e 7 *E. faecium*), isolati da endoprotesi biliari dopo rimozione della protesi stessa. DNA plasmidico era presente in 10 ceppi di *E. faecalis* ed in 2 ceppi di *E. faecium*. In 6 ceppi (3 *E. faecalis* e 3 *E. faecium*) si evidenziava una risposta ai feromoni sessuali prodotti da *E. faecalis* JH2-2 e/o *E. faecalis* OG1RF. Il controllo positivo era rappresentato da *E. faecalis* OG1RF(pCF10) e da *E. faecium* LS10 (pBRG1) che contengono plasmidi feromono-sensibili. Utilizzando primers interni a geni per AS, si ottenevano degli amplificati nei ceppi di *E. faecalis* (gene *prgB*) e di *E. faecium* (gene *ash701*). L'adesività dei 19 ceppi è stata valutata mediante esperimenti di adesione a cellule Caco-2, utilizzando una molteplicità di infezione di circa $1,5 \times 10^2$ batteri per cellula. Tutti i ceppi erano capaci di aderire alle cellule, anche se con percentuali di adesione variabili da ceppo a ceppo. La capacità adesiva dei ceppi *prgB*-positivi di *E. faecalis* e *ash701*-positivi di *E. faecium*, per lo più maggiore di quella degli altri ceppi, aumentava di 2-4 volte dopo stimolazione con feromoni sessuali. La presenza di 6 ceppi su 19 che presentano una risposta a feromoni sessuali sembra suggerire che questa caratteristica possa giocare un ruolo importante nell'adesione e colonizzazione delle endoprotesi biliari.

APOPTOSI E RISPOSTA ALLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE AD ALTA ATTIVITA' IN PAZIENTI HIV

¹S. Grelli, ³M. Lichtner, ⁴F. Lauria, ⁴F. Montella, ¹L. Di Traglia, ¹C. D'Agostini, ¹S. Sacconi, ³V. Vullo, ⁵S. Vella, ¹C. Favalli, ²B. Macchi, e ⁶A. Mastino

¹Dip. Med.Sper.&Sci.Biochim., P.T.V., e ²Dip. Neuroscienze, Univ. Roma "Tor Vergata"; ³Dip. Mal.Infet.&Tropic., Univ. Roma "La Sapienza"; ⁴Ospedale S.Giovanni; ⁵I.S.S.; Roma. ⁶Dip. Sci. Microbiol., Gen. & Mol., Univ. Messina, Messina.

L'introduzione della terapia antiretrovirale ad alta attività (HAART) nell'infezione da HIV ha influenzato notevolmente non solo la risposta virologica, ma anche l'immunocostituzione, sostenuta in gran parte dall'aumento del numero totale delle cellule CD4+ circolanti. Oltre agli altri meccanismi, è stato supposto che gli effetti immunocostitutivi della HAART siano legati ad un ridotto livello di apoptosi. In effetti, un nostro primo studio a sei mesi di HAART, che ha preso in esame un gruppo altamente omogeneo di pazienti HIV positivi, ha messo in evidenza una diminuzione precoce dell'apoptosi dei linfociti di sangue periferico, significativamente correlata direttamente con la diminuzione della carica virale e inversamente con il numero totale delle cellule CD4+, ed una parallela diminuzione dell'espressione di Fas (Grelli et al., AIDS 2000). Lo studio longitudinale è proseguito ed ha evidenziato che l'apoptosi dopo i primi 6 mesi tendeva progressivamente a normalizzarsi. In alcuni casi l'apoptosi è stata valutata anche mediante positività all'annessina, che risultava diminuita in maniera sovrapponibile nelle sottopopolazioni CD4+ e CD8+. Anche i livelli di apoptosi indotta da anti-Fas diminuivano in seguito a terapia. Inoltre, dopo 24 mesi di HAART, si recuperava quasi totalmente la capacità di rispondere alla stimolazione con anti-Fas. Durante lo studio longitudinale intrapreso si sono verificati 3 casi di non aderenza alla terapia dopo una prolungata soppressione della carica virale per un tempo significativo. In seguito all'interruzione del trattamento in tutti e 3 i pazienti è stato osservato un aumento della replicazione virale seguito da un repentino aumento dell'apoptosi, mentre il numero dei CD4+ non ha mostrato variazioni. In seguito alla riassunzione della terapia sia la carica virale che l'apoptosi ritornavano a valori bassi. I nostri risultati indicano che una prolungata risposta alla terapia metterebbe il paziente in grado di avviare, in presenza di elevata fase viremica causata da interruzione della terapia, un efficiente meccanismo di immunocostituzione compensativa anche in presenza di elevati livelli di apoptosi. Finanziato da: I.S.S. Prog.AIDS; MUIR PRIN; CNR P.S. "Det.salute e invecchiamento".

HSV-1 INIBISCE L'APOPTOSI MEDIATA DA FAS IN CELLULE U937 MEDIANTE ATTIVAZIONE DI NF-kB

¹D. Perri, ²M.T. Sciortino, ¹M.A. Medici, ²E. Avitabile, ¹V. Valveri, ³M. Ciotti, ³C. Matteucci, ⁴C. Amici, ⁵E. De Smaele, ¹e A. Mastino.

¹Dip. Sci. Microbiol. Gen. & Mol., Univ. Messina; ²Dip. Patologia Sper., Sez. Microbiol. e Virol., Univ. Bologna; ³Dip. Med. Sper. & Sci. Bioch., P.T.V., Univ. Roma "Tor Vergata"; ⁴Dip. di Biologia, Univ. Roma "Tor Vergata"; ⁵The G. Knapp Center for Lupus & Immunol. Res., Univ. of Chicago.

Gli herpesvirus sembrano esercitare un fine controllo della risposta cellulare apoptotica, attraverso il coinvolgimento di meccanismi ancora non completamente conosciuti. Utilizzando come modello sperimentale la linea cellulare monocitoide U937 infettata con HSV-1, abbiamo studiato la capacità del virus di regolare l'apoptosi. HSV-1 è in grado, in questa linea, di indurre apoptosi in maniera dose e tempo dipendente e l'induzione di apoptosi è associata ad infezione produttiva. Nella fase precoce dell'infezione, però le cellule risultavano protette dall'apoptosi indotta mediante stimolazione di Fas. Inoltre, si osservava lo stesso effetto anche quando le cellule venivano infettate con virioni inattivati agli U.V.. Abbiamo quindi ipotizzato che la responsabilità del fenomeno fosse da attribuire ad un componente strutturale del virione ed in particolare alla glicoproteina D. Cocoltivando cellule U937 con una linea cellulare trasfettata con gD di HSV-1 ed in grado di esprimerla sulla superficie cellulare, le cellule U937 divenivano meno sensibili all'apoptosi indotta via Fas. Lo stesso fenomeno era evidenziato quando le cellule venivano esposte al mezzo condizionato proveniente dalle cellule trasfettate. Abbiamo quindi trattato le cellule U937 direttamente con due forme di gD ricombinante. Il trattamento rendeva le cellule resistenti all'apoptosi indotta via Fas, senza modificare l'espressione del recettore di morte. In seguito al trattamento con gD, nelle cellule U937 risultava attivato il fattore di trascrizione NF-kB e l'inibizione dell'apoptosi indotta via Fas veniva abolita in cellule U937 stabilmente trasfettate con un inibitore dominante negativo di NF-kB (I-kB α) μ . Inoltre, l'effetto protettivo sull'apoptosi indotta via Fas veniva abolito utilizzando anticorpi monoclonali che interferivano sul legame tra gD ed il suo recettore HveA. Questi risultati identificano una via di trasduzione del segnale che viene attivata dall'interazione di gD con HveA e, tramite l'attivazione di NF-kB, inibisce l'apoptosi indotta da Fas. Finanziato da: MUIR PRIN; Università di Messina; CNR P.S. "Det.salute e invecchiamento" e P.C. "Attività di signaling indotte dalla infezione con virus herpes simplex".

ATTIVITÀ IN VITRO DI LEVOFLOXACINA VERSO ISOLATI CLINICI DA PAZIENTI NEUTROPENICI

Di Bonaventura G.¹, D'Antonio D.², Catamo G.¹, Piccolomini R.¹

¹Dipartimento di Scienze Biomediche, Laboratorio di Microbiologia Clinica, Università "G. D'Annunzio", Chieti; ²Divisione di Ematologia ed Oncologia, Ospedale Civile, Pescara.

Background = I pazienti neutropenici sono estremamente vulnerabili ad un esteso spettro di infezioni a causa della terapia citotossica, della presenza di cateteri e di procedure invasive. I fluorochinoloni sono stati largamente impiegati nel management del paziente neutropenico sia a scopo terapeutico che profilattico. Levofloxacin è un fluorochinolone dotato di un'ottima attività battericida *in vitro* nei confronti di un esteso spettro di patogeni Gram-positivi e Gram-negativi. **Scopo dello studio** = Determinare l'attività *in vitro* di levofloxacin nei confronti di isolati clinici da pazienti neutropenici. **Materiali e metodi** = Sono stati testati 223 (103 stafilococchi, 120 Gram-negativi) stipiti batterici isolati da pazienti neutropenici. La maggior parte dei microrganismi è stata isolata da campioni respiratori (35%), quindi da emocolture (26%), urine (20%), e tamponi cute/ferita (19%). Alcuni isolati provenivano da pazienti che avevano ricevuto fluorochinoloni a scopo terapeutico o profilattico. L'attività di levofloxacin e ciprofloxacina è stata determinata *in vitro* mediante l'impiego di Epsilometer test (E test) (AB Biodisk, Solna, Svezia). **Risultati** = Levofloxacin e ciprofloxacina hanno inibito il 26.2% (27/103) degli stafilococchi isolati ad una concentrazione pari a ≤ 2 mg/ml e ≤ 1 mg/ml, rispettivamente. In particolare, levofloxacin è risultata essere maggiormente attiva di ciprofloxacina verso *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti e *Staphylococcus epidermidis* meticillino-sensibili. Tutti i ceppi di *S. aureus* meticillino-sensibili sono stati inibiti da ciprofloxacina e levofloxacin ad una concentrazione pari a ≤ 0.5 mg/ml e ≤ 0.25 mg/ml, rispettivamente. Nei confronti dei microrganismi Gram-negativi, levofloxacin è risultata più attiva di ciprofloxacina, inibendo il 70% ed il 65% degli isolati, rispettivamente. In particolare, i due chinoloni hanno mostrato attività comparabile verso *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Levofloxacin e ciprofloxacina sono risultate particolarmente attive verso *Klebsiella pneumoniae* ed *Enterobacter cloacae* (MIC ≤ 0.125 mg/ml). Levofloxacin ha mostrato un'attività significativamente (P < 0.001, χ^2 test) maggiore rispetto a ciprofloxacina nei confronti di *Stenotrophomonas maltophilia*, inibendo il 68.4 ed il 52.6% degli isolati, rispettivamente. Levofloxacin ha mostrato un'attività inferiore a quella di ciprofloxacina solo nei confronti di *Enterobacter cloacae*. **Conclusioni** = In generale, levofloxacin ha mostrato un'attività comparabile rispetto a ciprofloxacina, sebbene siano state registrate lievi differenze specie-specifiche. In particolare, i nostri dati suggeriscono come levofloxacin può essere potenzialmente considerata nella terapia delle infezioni da *S. maltophilia* in pazienti neutropenici.

LA CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA DI CEPPI DI *S.PYOGENES* ERITROMICINO-RESISTENTI

Giuseppina DeGregorio, Eugenio Debbia

Istituto di Microbiologia, Università di Genova.

Recenti dati di letteratura indicano un aumento di incidenza di resistenza agli antibiotici fra i patogeni respiratori, in Italia come nel resto del mondo. Confrontando la situazione italiana con quella di altri Paesi europei, come Francia e Spagna, si può affermare che questa incidenza si è comunque mantenuta a livelli piuttosto stazionari per quanto riguarda *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* mentre, per quanto riguarda lo *Streptococcus pyogenes*, è stato osservato un andamento oscillante dell'incidenza di resistenza ad eritromicina. Di qui la necessità di un costante monitoraggio dell'incidenza di eritromicina-resistenza nello *S. pyogenes*. È stata studiata l'evoluzione della resistenza ai macrolidi di *S. pyogenes* nel periodo tra il 1997 e 1998 incluso l'analisi del genotipo mediante PFGE. La resistenza è passata da circa il 40% nell'anno 1997 a circa il 25% nell'anno 1998, dimostrando l'andamento altalenante di questo carattere in questo patogeno. L'analisi del profilo genomico dello *S.pyogenes* ha mostrato con una certa chiarezza che il fenotipo C era sempre dotato di un alto grado di polimorfismo ovvero presentava diversi profili di restrizioni ascrivibili alla diversa origine clonale dei patogeni in esame. Diversi sono invece apparsi i risultati ottenuti con i fenotipi M ed I ove era possibile osservare la presenza di pochi cluster di resistenza, differenti fra di loro per poche bande di DNA che ne sottolineavano la possibile origine clonale comune. Da qui l'ipotesi che soltanto un ristretto numero di cloni sia in grado di acquisire certi tipi di resistenza e circoli quindi in misura preponderante. L'inserzione sul cromosoma di geni di resistenza può d'altra parte avvenire in maniera tale da modificare il peso molecolare e quindi la mobilità delle bande ottenute, soprattutto se l'inserzione avviene nei pressi o all'interno di un sito di restrizione. Si può pertanto presupporre che le sovrapposizioni tra i pattern di ceppi diversi possano essere maggiormente attribuibili al sierotipo anziché alle caratteristiche di resistenza ad eritromicina, le quali vengono forse più facilmente acquisite da alcuni sierotipi piuttosto che da altri.

ISOLAMENTO DI PATOGENI PRODUTTORI DI BIOFILM IN SOGGETTI CON MALATTIE METABOLICHE

Dolcino M.¹, E.A. Debbia¹, A. Piazzì, A. Berio²

¹Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Genova

²Cattedra di Pediatria, Università degli Studi di Genova

I pazienti con malattie metaboliche sono particolarmente sensibili alle infezioni, che presentano anche un decorso grave. Molte infezioni sono causate da germi resistenti agli antibiotici responsabili spesso dell'exitus dei pazienti. I biofilms appaiono particolarmente importanti nel provvedere un *habitat* od un reservoir per questi germi e spiegano la difficoltà nello sradicare le infezioni di tali microrganismi. Data l'importanza della presenza dei biofilms nel provocare gravi infezioni, abbiamo preso in considerazione la presenza di germi produttori di biofilms nei liquidi organici (saliva parodontale ed urine) in 10 pazienti affetti da malattie metaboliche. La presenza di biofilms, costituiti da mucoesosaccaridi (alginato), è stata dimostrata con il metodo di Freeman. Su 10 campioni prelevati da pazienti affetti da malattie metaboliche (iperaminoaciduria, 3 casi; iperlipemia familiare, 1 caso; intolleranza agli zuccheri, 2 casi; cistinuria, 1 caso; iperlattacidemia, 1 caso; omocistinuria, 1 caso; organico aciduria, 1 caso) 4 non hanno presentato sviluppo di germi; in 3 sono stati isolati microrganismi che non hanno prodotto biofilm; in 2 sono stati isolati batteri produttori di biofilm: uno stesso paziente con intolleranza agli zuccheri e deficit immunitario da gammopatia monoclonale ha presentato nelle urine sviluppo di due specie diverse di batteri Gram-negativi capaci di produrre biofilm (*Alcaligenes faecalis* e *Proteus spp.*); un germe Gram-negativo biofilm-produttore (*Klebsiella ornithinolytica*) è stato isolato dalla saliva parodontale di un paziente con familiarità per iperlipemia.

Questi dati dimostrano che la produzione di biofilms in pazienti affetti da malattie metaboliche è possibile; ma è favorente la presenza di fattori concomitanti: in un soggetto la presenza di gammopatia monoclonale, in un altro la presenza di una superficie liscia, su cui i germi possono aderire e svilupparsi (gengive e denti, oltre che protesi, cateteri, valvole artificiali). (Costerton *et al.*, 1999).

In conclusione, i germi produttori di biofilm possono giocare una parte importante nelle infezioni che compaiono nelle malattie metaboliche. È pertanto importante ricercare la loro presenza in infezioni gravi di soggetti affetti da malattie metaboliche in quanto le strategie di trattamento convenzionale sono inefficaci contro i germi produttori di biofilm e, nuovi antibiotici debbono essere studiati ed impiegati per superare tali condizioni.

SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA DEI MICROORGANISMI ISOLATI IN DUE OSPEDALI DI GENOVA

Tripodi F.¹, R. Bandettini², E.A. Debbia¹, E. Tonoli¹

¹Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Genova

²Ospedale Gallino Genova-Pontedecimo

Le infezioni nosocomiali rappresentano un importante capitolo della patologia infettiva per la loro gravità, difficoltà terapeutiche e aspetti socio economici. Il presente studio si propone di fornire dati preliminari relativi all'Ospedale S.Martino e all'Ospedale Gallino di Genova, per un periodo di circa sei mesi.

Nell'Istituto di Microbiologia sono stati studiati 3038 microrganismi di cui le specie più rappresentative sono risultate essere *E.coli* (16%), *P.aeruginosa* (8%), *K.pneumoniae* e *E.cloacae* tra i gram-negativi, *S.aureus* (12%), *S.epidermidis* (5%) e *E.faecalis* tra i gram-positivi. L'incidenza della meticillino-resistenza in *S.aureus* era circa il 36% mentre tra gli *S.epidermidis* il 60%, per quanto riguarda le *Enterobacteriaceae* gli antibiotici più efficaci si sono dimostrati essere: imipenem (100% sensibili), cefotaxime e ceftazidime in particolare nei confronti di *E.coli* (97 e 96% di ceppi sensibili), piperacillina/tazobactam (97% di *E.coli* sensibili e 94% *K.pneumoniae*), tra gli antibiotici delle altre classi la ciprofloxacina si è dimostrata la più efficace con più dell'80% di ceppi sensibili. I nostri dati hanno registrato per *P.aeruginosa*, una sensibilità all'imipenem pari all'88%, 86% al ceftazidime, 76% a piperacillina /tazobactam e 60% a ciprofloxacina, valori comparabili a quelli di un precedente studio (Gianoglio S. *et al.* 1999 GIMMOC vol.III).

Nel laboratorio di analisi dell'Ospedale Gallino sono stati isolati 567 microorganismi comprendenti 364 gram-negativi e 203 gram-positivi, in particolare le specie più frequenti erano *E.coli* (36%) e *S.aureus* (15%), per quanto riguarda i profili di resistenza agli antibiotici si sono ottenuti dati sovrapponibili a quelli dell'Ospedale S.Martino, con oltre il 90% di sensibilità a cefotaxime e ceftazidime e a ciprofloxacina nelle *Enterobacteriaceae*, mentre *P.aeruginosa* si è dimostrato essere più resistente a ceftazidime (65% di sensibili) e cefotaxime (35%) ma più sensibile a ciprofloxacina, d'altra parte l'incidenza della meticillino-resistenza tra gli *S.aureus* risultava minore (25%), la paragonabilità dei dati è comunque limitata dalla differenza del tipo di reparti nei due nosocomi.

Un continuo programma di sorveglianza batterica nei singoli ospedali può costituire un'importante fonte di informazione utile per impostare in modo più razionale la prevenzione e il trattamento delle varie patologie scongiurando il pericolo dell'insorgenza di ulteriori resistenze verso i più comuni antibiotici utilizzati.

SENSIBILITÀ IN VITRO AGLI ANTIBIOTICI DI 160 STREPTOCOCCI VIRIDANTI DEL CAVO ORALE ISOLATI A GENOVA

Dolcino M., G. Dho., M. Bozzolasco, A. Marchese

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Genova

Gli streptococchi viridanti rappresentano una componente cospicua dei microrganismi commensali che popolano le alte vie respiratorie. Considerati patogeni emergenti nei neonati, essi sono sovente isolati da pazienti neutropenici e non di rado sono causa di endocarditi. Questo gruppo di batteri veniva considerato uniformemente sensibile ai beta-lattamici e agli altri antibiotici. Tuttavia a partire dagli anni ottanta sono stati segnalati molteplici casi di insorgenza di ceppi isolati dalla popolazione microbica orale, esprimenti alti livelli di resistenza nei confronti dei più accreditati antimicrobici. L'insorgenza di tali ceppi è fenomeno emergente non soltanto nelle aree in cui è diffuso lo pneumococco penicillino-resistente quali la Spagna, ma anche in altre zone considerate a basso livello di incidenza di pneumococchi resistenti come l'Olanda. Pur non essendo di per sé microrganismi particolarmente patogeni, gli streptococchi viridanti rappresentano comunque un potenziale pericolo perché possono considerarsi un serbatoio di markers di resistenza di diversi antibiotici facilmente trasmissibili a specie senz'altro patogene quali *Streptococcus pneumoniae*. Accanto allo sviluppo della resistenza ai beta-lattamici appare preoccupante quello della refrattarietà alla eritromicina, farmaco raccomandato quale valida alternativa per il trattamento di pazienti allergici alla penicillina. Nel corso di questo studio sono state valutate le minime concentrazioni inibenti (MIC) di diversi antibiotici nei confronti di 160 streptococchi viridanti eritromicina-resistenti, isolati dalla popolazione microbica del cavo orale. L'eritromicina resistenza era distribuita come segue: 8.7% intermedio (MIC=0.5 mg/L) e 91.3% elevato (MIC \geq 1 mg/L) livello di resistenza. Il 34% dei ceppi studiati è risultato resistente alla penicillina, rispettivamente 32% e 2% ad intermedio (MIC=0.25-2 mg/L) ed elevato livello di resistenza (MIC \geq 4 mg/L). Non è stato registrato alcun ceppo resistente a levofloxacina (range: £0.015-2) mentre il 50% e il 4.3% dei ceppi sono risultati resistenti rispettivamente a tetraciclina e cloramfenicolo.

ATTIVITÀ BATTERICIDA *IN VITRO* DI NUOVI FLUOROCHINOLONI CONTRO PNEUMOCOCCHI VANCOMICINO-TOLLERANTI

Gualco L., E. Tonoli, A. Zoratti, A. Marchese, G. C. Schito
Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Genova

Negli ultimi anni l'incidenza di pneumococchi penicillino-resistenti e multi-resistenti è aumentata con ritmo allarmante in tutto il mondo. Un'ulteriore minaccia è rappresentata dalla recente descrizione dell'insorgenza di ceppi vancomicino-tolleranti. Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'attività *in vitro* di alcuni nuovi fluorochinoloni contro stipiti di *S. pneumoniae* vancomicino-tolleranti. L'attività battericida di levofloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin, clinafloxacin e vancomicina è stata saggiata mediante curve di batteriocidia, come descritto da Novak *et al.* (Nature 339: 590-593, 1999), eseguite su 9 pneumococchi vancomicino-tolleranti, già precedentemente descritti (Marchese *et al.*, abstract 1778 40th ICAAC, 2000). Il ceppo di riferimento vancomicino-sensibile R6 è stato usato come controllo. Le curve di batteriocidia confermano la tolleranza alla vancomicina e mostrano una pronunciata attività battericida da parte di tutti i fluorochinoloni valutati. In particolare, dopo 4 ore di esposizione l'inoculo iniziale aveva subito una riduzione variabile da 99.9 a 99.999% in seguito a trattamento con levofloxacin, trovafloxacin e clinafloxacin e da 99.3 a 99.99% se trattato con gemifloxacin e moxifloxacin, in relazione al ceppo studiato. Dopo 6 ore di esposizione l'inoculo iniziale era stato ridotto a 0.01 o <0.001% per tutti i fluorochinoloni. Non è stata osservata alcuna ricrescita dopo ulteriore incubazione.

Sulla base di questi risultati i nuovi fluorochinoloni attivi contro patogeni Gram-positivi sembrano conservare la loro attività battericida anche nei confronti di pneumococchi vancomicino-tolleranti. Quindi molecole appartenenti a questa classe e dotate di proprietà farmacocinetiche appropriate possono rappresentare un'alternativa efficace nella terapia contro gravi infezioni causate da pneumococchi, incluso la meningite.

STUDIO PRELIMINARE 1997-2000 SULL'INSORGENZA DI RESISTENZE AI FARMACI UTILIZZATI NEL TRATTAMENTO DELLE INFEZIONI NOSOCOMIALI IN CEPPI ISOLATI IN REPARTI DI TERAPIA INTENSIVA

A. Zoratti, M. Bozzolasco, E. Tonoli, G. Dho e A. Marchese
Istituto di Microbiologia C.A. Romanzi, Università di Genova.

L'aumento di resistenza agli antibiotici nei principali microrganismi isolati in pazienti ospedalizzati con infezioni gravi come polmoniti, infezioni intraddominali e batteriemie è imputabile alla forte pressione selettiva dei farmaci stessi; questa resistenza è particolarmente sentita nei reparti di terapia intensiva dove il problema diventa ancora più importante in relazione alle condizioni predisponenti i pazienti.

È stato condotto uno studio preliminare teso a monitorare l'evoluzione delle resistenze verso alcuni farmaci di specie maggiormente coinvolte in infezioni nosocomiali, come stafilococchi e Gram-negativi a rapida crescita. Lo studio abbraccia un periodo compreso tra il 1997 ed il 2000, confrontando l'evoluzione delle resistenze nei primi tre mesi di ogni anno.

Da una prima analisi risulta un sostanziale aumento nella Oxacillina-sensibilità dei ceppi di *S.aureus* e di *S.epidermidis*, passata rispettivamente da 51.3% a 75.5% per *S. aureus* e da 25% a 54% per *S.epidermidis*.

Per ciò che riguarda la famiglia delle *Enterobacteriaceae*, e più precisamente con *E.coli* preso come indice, i carbapenemici risultano essere farmaci d'elezione, con un 100% di sensibilità nei ceppi isolati per gli anni considerati, in apparente controtendenza rispetto ai chinoloni, che invece mostrano una sensibile riduzione dell'attività antibatterica; notevole efficacia mostrano anche le associazioni di farmaci, con particolare riferimento a Amoxicillina/acido Clavulanico e Piperacillina/Tazobactam, dove le percentuali di sensibilità variano tra l'70% e il 90%.

Si conferma la necessità di approfondire ulteriormente lo studio e l'analisi dei dati per poter così avere uno scenario più chiaro della situazione attuale, conditio sine qua non per poter affrontare in maniera più razionale ed efficace l'insorgenza di resistenze ai farmaci nella quotidiana lotta alle infezioni nosocomiali.

ATTIVITÀ IN VITRO DI ROKITAMICINA NEI CONFRONTI DI CEPPI GENOTIPICAMENTE BEN CARATTERIZZATI DI *S.PNEUMONIAE* ERITROMICINO-RESISTENTI .

Tonoli E., M. Bozzolasco, L. Gualco, A. Marchese, E. A. Debbia, G.C.Schito

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Genova

Il livello di sensibilità ai macrolidi (M), streptogramine B(S_B) e Lincosamidi (L) in *S.pneumoniae* dipende dall'espressione di diversi determinanti genetici. Per questa ragione alcune molecole appartenenti ai gruppi sopra menzionati possono essere attive sia nei confronti dei pneumococchi recanti il gene *ermB* sia di quelli recanti il gene *mefA*.

Scopo di questo studio era di valutare l'attività in vitro di rokitamicina nei confronti di ceppi di *S.pneumoniae* eritromicino resistenti ben caratterizzati genotipicamente.

Sono stati analizzati 40 ceppi di *S.pneumoniae* eritromicino-resistenti di cui 20 con fenotipo costitutivo MLS_B, 20 con fenotipo M, e 20 eritromicino-sensibili. I geni *ermB* e *mefA* sono stati amplificati mediante PCR. Le minime concentrazioni inibenti di rokitamicina, eritromicina, azitromicina e claritromicina sono state determinate mediante il metodo della microdiluizione in brodo, seguendo le linee guida dell'NCCLS (2000).

Rokitamicina e claritromicina, in termini di MIC₉₀ (0.015 mg/L) si sono dimostrate le molecole più potenti nei confronti dei pneumococchi eritromicino-sensibili, le loro Mic erano generalmente 1 o 2 diluizioni più basse rispetto a quelle di eritromicina e azitromicina (MIC₉₀ 0.06 mg/L). Rokitamicina era anche l'antibiotico più attivo verso i ceppi con fenotipo M (MIC₉₀ 0.06 mg/L), con una potenza fino a 130-volte maggiore di quella di eritromicina, claritromicina e azitromicina (MIC₉₀ comprese tra 8-16 mg/L). I ceppi di *S.pneumoniae* che possedevano il gene *ermB* erano meno sensibili a tutti gli antibiotici: MIC₉₀ 128 mg/L per rokitamicina e claritromicina e >256 mg/L per azitromicina e eritromicina, si è comunque ottenuta una distribuzione bimodale (1-4 e 32-128 mg/L) dei valori delle minime concentrazioni inibenti di rokitamicina.

Rokitamicina si è dimostrato l'antibiotico più potente nei confronti sia dei pneumococchi eritromicino-sensibili sia di quelli con fenotipo di resistenza M, inoltre ha un'interessante attività contro alcuni ceppi caratterizzati da espressione costitutiva del gene *ermB*. In paesi dove la resistenza ai macrolidi è dovuta in prevalenza all'espressione del gene *mefA* i composti a 16 atomi di carbonio potrebbero rappresentare una interessante alternativa nella terapia.

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI UN CEPPLO DI *ESCHERICHIA COLI* TOLLERANTE AI CHINOLONI.

Dolcino M., A. Zoratti, E.A. Debbia

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Genova

I chinoloni rappresentano una classe di farmaci caratterizzata da una rapida attività battericida, il cui utilizzo nella terapia di molteplici infezioni batteriche è stato marcatamente incrementato negli anni recenti. Benchè sia noto ormai da tempo che i chinoloni siano in grado di inibire la replicazione del DNA mediante il blocco delle topoisomerasi batteriche, non è ancora ben delineato il loro meccanismo d'azione. L'isolamento e lo studio di mutanti che manifestino una certa tolleranza ai chinoloni può offrire notevoli spunti per comprendere il complesso meccanismo d'azione di questi potenti farmaci. A tal fine è stata messa a punto una metodica che ci ha consentito di identificare alcuni mutanti tolleranti ai chinoloni. In pratica un ceppo privo del gene *lac* e veicolante un plasmide F *lac* (10⁹ CFU/ml in 20 ml di brodo di coltura) è stato coltivato in presenza di dosi scalari di acido nalidixico (nal, MIC=4mg/L). Dopo incubazione per una notte a 37°C le cellule delle colture che non presentavano crescita visibile sono state raccolte mediante centrifugazione ed incubate per tre ore a 37°C per azzerare ogni residuo effetto antibiotico nei sopravvissuti. La coltura è stata quindi concentrata in 1 ml ed adeguate diluizioni sono state seminate su piastre di Mc Conkey agar contenenti 2 mg/L di nal. Essendo noto che un ceppo tollerante ad un antibiotico subisce un rallentamento della crescita senza accusare alcun effetto letale anche in presenza di alte concentrazioni di farmaco, un tale mutante dovrebbe sopravvivere a concentrazioni superiori alla minima concentrazione inibente (MIC) del composto pur risentendo degli effetti propri delle concentrazioni sub-inibenti, come ad esempio la perdita di un plasmide (cura) F *lac*.. Per avvalorare tale ipotesi le colonie che presentavano papille *lac*-negative sono state analizzate per determinarne la sensibilità al nal. Sono state isolate sei colonie con tali caratteristiche, una MIC oscillante tra 16 e 64 mg/L ed una minima concentrazione battericida (MBC) sino a 2048 mg/L. I disegni delle curve di batteriocidia hanno rivelato per i ceppi tolleranti una riduzione di circa 1 Log dopo 24 ore di trattamento contro quella superiore ai 3 Log del parentale. La tolleranza manifestata da questi ceppi non sembra essere correlata ad una diminuita permeabilità nei confronti dell'acido nalidixico, poiché i valori delle MIC non vengono influenzati dall'aggiunta di EDTA 0,25 x 10⁻³M. Sono attualmente in corso saggi genetici con l'intento di localizzare la mutazione responsabile della tolleranza.

STRATEGIE DI SOPRAVVIVENZA DEI FUNGHI MICORRIZICI

MANUELA GIOVANNETTI

Dipartimento di Chimica Biotecnologie Agrarie, Università di Pisa,
Via del Borghetto 80, 56124 Pisa..

I funghi micorrizici arbuscolari, appartenenti agli Zygomycetes, sono biotrofi obbligati che stabiliscono simbiosi mutualistiche - le micorrizze arbuscolari - con le radici di circa l'80% delle specie vegetali. Essi hanno un ruolo fondamentale nella nutrizione delle piante, poichè sono capaci di assorbire, attraverso le ife extraradicali, elementi minerali dal suolo e trasferirli alla pianta ospite. Ricerche recenti hanno dimostrato sia trasferimento di carbonio e fosforo tra specie diverse di piante interconnesse da un micelio micorrizico comune, sia una più elevata diversità floristica in presenza di funghi micorrizici arbuscolari, che potrebbero rappresentare dei fattori importanti nella redistribuzione delle risorse all'interno delle comunità vegetali. I funghi micorrizici arbuscolari producono spore nel terreno che sono in grado di germinare e crescere in assenza dell'ospite, ma sono incapaci di produrre grandi quantità di micelio e di completare il loro ciclo vitale senza stabilire una simbiosi funzionale con una pianta ospite. Tale comportamento appare incoerente, trattandosi di microrganismi biotrofi obbligati, e potrebbe aver rappresentato un forte svantaggio selettivo. Nondimeno, questi microrganismi sono considerati dei "fossili viventi", in quanto erano presenti come simbionti micorrizici già 410-360 milioni di anni fa. Il loro successo evolutivo indica che essi hanno sviluppato efficienti strategie di sopravvivenza per compensare la mancanza di regolazione della germinazione. La bassa specificità d'ospite indubbiamente rappresenta una efficace strategia per aumentare la probabilità delle spore germinate di stabilire contatti con piante ospiti, anche se non appare sufficiente a spiegare la grande capacità di sopravvivenza di questi organismi ancestrali. Nel presente lavoro saranno presi in considerazione i più recenti sviluppi delle ricerche che hanno contribuito a comprendere alcuni dei meccanismi evolutivi conservati nei funghi micorrizici arbuscolari che hanno permesso la loro sopravvivenza come individui e popolazioni.

ATTIVITA' ANTIBATTERICA DI CARBONI ATTIVATI DERIVATI DA GUSCI DI *Corylus avellana* L.

Laganà M.G., De Domenico C., Bucolo M.D., Lombardo L. Bisignano G.

Dipartimento Farmaco-Biologico- Sezione di Microbiologia
Università degli Studi di Messina

Corylus avellana L., comunemente noto come nocciolo, è un arbusto a foglia caduca presente su tutto il territorio italiano. Nel tentativo di dare una destinazione d'uso ai gusci di nocciola, prodotto vegetale di scarto, ed al contempo di ricercare materiali ad uso disinfettante ed antisettico, è stato prodotto un carbone da impiegare come carrier per la produzione di un sistema biocida, contenente argento, utilizzabile per la decontaminazione delle acque e dell'aria.

I carboni attivati, infatti, grazie all'elevata porosità ed alla grande superficie interna, sono in grado di adsorbire sostanze chimicamente differenti attraverso un processo chimico-fisico di adsorbimento aspecifico; a questa azione di filtro adsorbente è stata accoppiata l'azione antibatterica per dispersione nel carbone, sulla superficie o internamente, di ioni argento o di fini particelle d'argento. Le caratteristiche principali di questo carbone sono: area di superficie circa 345 m²/g; peso specifico 1,008 g/ml; solubilità in acqua 4,11%; contenuto di carbonio totale 87,4%.

Sono stati preparati tre campioni: C700 HF, ad elevato contenuto di argento, C700 LF, a basso contenuto di argento e C700, privo di argento, e si è valutata, ad intervalli di tempo stabiliti, la loro attività antibatterica su ceppi standard ATCC: *Escherichia coli* 10538, *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Salmonella typhi* O901, *Enterococcus hirae* 10541.

Le prove in batch sono state condotte in agitatore termostato, a 25°C; la conta delle cellule vitali è stata preceduta da neutralizzazione dell'argento per diluizione.

La cinetica dell'attività antibatterica è stata valutata al tempo 0, 1, 3, 5 e 24 ore su ceppi standard ATCC Gram negativi: *Escherichia coli* 10538, *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Salmonella enteritidis* 15277, *Vibrio parahemolyticus* 17802.

Le prove eseguite in batch hanno dimostrato che il campione C700, privo di argento adsorbito, non possiede attività antibatterica mentre i campioni C700 HF e C700LF, con argento adsorbito, sono risultati attivi su tutti i ceppi saggiati, determinando, già dopo tre ore, un abbattimento della carica batterica rispettivamente di quattro e due unità logaritmiche.

In considerazione dei risultati ottenuti, possiamo auspicare l'impiego di questi carboni attivati nella preparazione di sistemi chimico-fisici per il trattamento di acque inquinate.

ANALISI DEL GENOMA PER LO STUDIO DELLA PATOGENICITÀ DELLO STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Marco R. Oggioni, Francesco Iannelli, Gianni Pozzi

Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Università di Siena

Nel 2001 sono state pubblicate le sequenze genomiche di tre ceppi di *Streptococcus pneumoniae* (pneumococco) di diverso sierotipo. La disponibilità di intere sequenze genomiche consente uno studio sistematico della biologia e della patogenicità dello pneumococco.

Lo pneumococco è un organismo facilmente manipolabile geneticamente in virtù della sua naturale competenza per la trasformazione. Questa sua caratteristica insieme alla disponibilità di interi genomi sequenziati fa dello pneumococco un modello per lo studio della patogenicità batterica. L'analisi delle sequenze genomiche può essere indirizzata all'identificazione e catalogazione dei geni identici tra diversi isolati, di quelli variabili (ortologhi, paraloghi, a mosaico), di geni, operoni o vie metaboliche clone specifici e/o specie specifiche. I risultati di queste analisi sono la base per lo studio dell'espressione genica (transcriptoma / microchip) e produzione proteica (proteoma/elettroforesi 2D). Lo scopo di queste analisi è quello di individuare nuovi target da usare per la prevenzione (vaccini) e per la terapia (farmaci antimicrobici) di malattie infettive.

Risultati preliminari di comparazione genomica degli pneumococchi di tipo 2 (ceppo R6), tipo 4 (ceppo TIGR4) e tipo 19F (ceppo G54) hanno indicato una variabilità intra-specie a livello nucleotidica del 2% oltre al fatto che fino a 200 geni (5-10% del genoma) è formato da geni clone specifici. Fatto eccezione per i geni aggiunti, l'organizzazione del cromosoma è identica tra diversi isolati e non mostra segni di riarrangiamenti cromosomici maggiori anche in presenza di un elevato numero di elementi IS e alcune centinaia di elementi ripetuti. L'analisi delle proteine di superficie ha evidenziato che la frequenza di paraloghi correla con il meccanismo di ancoraggio, indicando le "choline binding proteins" (CBP) come le proteine meno conservate (7% di CBP presentano un paralogo in *Streptococcus*) rispetto alle proteine ancorate tramite LPXTG (45%), le lipoproteine (63%), e le proteine con sequenza segnale (75%). All'interno della specie *S. pneumoniae* il numero di proteine di superficie variabili è ristretto e si limita ad alcune CBP e le metalloproteasi.

ATTIVITÀ PROTETTIVA DI ANTICORPI KILLER ANTI-IDIOTIPO NELL'ASPERGILLOSI POLMONARE INVASIVA IN UN MODELLO MURINO DI TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO ALLOGENICO PRIVO DI LINFOCITI T.

Elio Cenci,¹ Antonella Mencacci,¹ Claudia Montagnoli,¹ Angela Bacci,¹ Katia Perruccio,² Walter Magliani,³ Stefania Conti,³ Luciano Polonelli,³ Luigina Romani¹

¹Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, ²Divisione di Ematologia e Immunologia Clinica, Dipartimento di Clinica e Medicina Sperimentale, Università di Perugia, e ³Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università di Parma.

Anticorpi monoclonali anti-idiotipo che rappresentano l'immagine interna di una tossina killer fungina (KT MAb), caratterizzati da un ampio spettro di attività antimicrobica, possono costituire un valido strumento terapeutico in differenti infezioni fungine. In questo studio è stata valutata l'attività antifungina di un KT MAb, K10, in un modello di aspergillosi polmonare invasiva in topi sottoposti a trapianto di midollo osseo allogenico privo di linfociti T. In tale modello gli animali risultavano altamente suscettibili all'infezione con *Aspergillus fumigatus* 3 giorni dopo il trapianto, quando presentavano una profonda neutropenia, sia a livello sistemico che polmonare. In tali condizioni sperimentali il trattamento con K10 MAb risultava nella sopravvivenza della maggioranza degli animali infettati, nella riduzione significativa della carica fungina nel parenchima polmonare e nel notevole miglioramento del quadro istopatologico. Esperimenti in vitro hanno inoltre dimostrato che K10 MAb era in grado di rallentare la germinazione dei conidi e di ridurre l'attività metabolica delle ife di *A. fumigatus*. Tali risultati indicano l'efficacia terapeutica di K10 MAb nei confronti dell'aspergillosi polmonare invasiva in topi trapiantati, suggerendo che l'impedimento della transizione da conidio ad ifa può rappresentare uno strumento cruciale nel trattamento delle infezioni da *A. fumigatus* in soggetti neutropenici.

Lavoro finanziato da: Progetto Nazionale di Ricerca AIDS, n. 50C.26 e n. 50C.27

L'INTERAZIONE DI CELLULE DENDRITICHE CON *ASPERGILLUS FUMIGATUS*: STUDI IN VITRO

S. Bozza*, R. Gaziano+, A. Spreca‡, A. Bacci*, C. Montagnoli*, P. di Francesco+, F. Bistoni* e L. Romani*.

Sezione di Microbiologia* e Anatomia‡, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia e Sezione di Microbiologia+, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università Tor Vergata, Roma.

Aspergillus fumigatus è un fungo ubiquitario ed opportunistico che provoca una grave infezione respiratoria, l'aspergillosi polmonare invasiva (IPA). Evidenze cliniche e sperimentali indicano che una disregolazione nella produzione di citochine da parte di linfociti T helper CD4⁺ può contribuire alla patogenesi di IPA. Le cellule dendritiche (DC) svolgono un ruolo di primaria importanza nella sorveglianza dei patogeni a livello delle superfici mucose e sono considerate le iniziatrici della risposta immunitaria specifica. Alla luce di queste considerazioni, nel presente lavoro abbiamo condotto studi al fine di valutare:

- i meccanismi di interazione tra DC e le due diverse forme del fungo (conidio e ifa)
- le modalità di fagocitosi del fungo da parte di DC isolate ex vivo dal polmone e da cellule dendritiche immature
- la maturazione funzionale delle DC in seguito all'interazione con il fungo
- gli effetti sulla risposta T helper.

Gli studi hanno dimostrato che:

- le DC fagocitano sia conidi che ife in maniera direttamente proporzionale al tempo di esposizione, con un optimum di fagocitosi intorno alle 2h.
- I meccanismi di internalizzazione del conidio e dell'ifa sono diversi: il conidio viene inglobato attraverso un avvolgimento a spirale (coiling), l'ifa mediante una fagocitosi a cerniera (zipper-type). Dentro le cellule, l'ifa viene degradata prontamente, mentre il conidio rimane integro a lungo. Al contrario, macrofagi alveolari, neutrofili e cellule epiteliali sono in grado di fagocitare solo il conidio.
- In seguito all'esposizione al fungo, le DC producono citochine diverse quali IL-12 in risposta al conidio ed IL-4/IL-10 in risposta all'ifa.
- Tuttavia, alla fagocitosi del conidio e dell'ifa, la DC matura ma non risponde con un aumento dell'espressione di molecole di costimolazione (CD80, CD86) ed di attivazione (MHC classII).
- Questi risultati indicano che esiste un dialogo del tutto peculiare tra le DC e le diverse forme di *A. fumigatus*, tale da poter giustificare lo spettro di risposte immunitarie protettive e non protettive al fungo.

Finanziato da Progetto Nazionale di Ricerche AIDS 50C.27, "Infezioni opportunistiche e Tubercolosi".

INFEZIONE TUBERCOLARE IN ETA' PEDIATRICA: RISULTATI RELATIVI A QUATTRO ANNI DI OSSERVAZIONE

Sanguinetti M., Ardito F., *Marconi P., **Mollicotti P., *Pallavicini F., ***Ticca F., **Zanetti S., Fadda G.

Istituto di Microbiologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore Roma

*Istituto di Malattie Infettive dell'Università Cattolica del Sacro Cuore Roma

**Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi Sassari

***Ospedale Pediatrico Bambino Gesù

INTRODUZIONE: Scopo del nostro studio è stato quello di valutare la specificità della "Ligase Chain Reaction" (LCR) nella diagnosi della malattia tubercolare del bambino avendo non già come riferimento la diagnosi clinica, ma la positività dell'esame colturale e di valutarne la sensibilità rispetto all'esame diretto. Sono stati rivalutati tutti i campioni pervenuti al nostro laboratorio che fossero risultati, nel periodo 1997- Giugno 2001, positivi ad un esame microscopico diretto per forme alcool-acido resistenti, o all'esame colturale per micobatteri, oppure alla LCR per *M.tuberculosis complex*.

MATERIALI E METODI: Sono stati esaminati 70 campioni: 27 aspirati gastrici, 12 aspirati tracheali o lavaggi broncoalveolari, 18 biopsie linfonodali, 4 campioni di liquor, 4 di urine, 1 di sangue, 1 di feci e 1 biopsia cutanea. Ogni campione è stato suddiviso in tre aliquote ed esaminato direttamente dopo colorazione di Ziehl-Neelsen, coltivato in MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube - Becton Dickinson Microbiology system), analizzato con LCR (LCX - *M. tuberculosis* Abbott)

RISULTATI: In base all'esame colturale sono state identificate 69 micobatteri: 46 tubercolari e 23 NTB. In tutti i casi di micobatteriosi tubercolare (polmonare, linfonodale e meningea) la LCR per *M.tuberculosis* si è dimostrata più sensibile dell'esame diretto. Nessun caso di positività della LCR è stato rilevato nei casi di micobatteri non tubercolari. Assumendo per l'esame colturale una sensibilità e una specificità del 100%, complessivamente in tutti i casi di tubercolosi la LCR ha dimostrato una sensibilità dell' 84.7% e una specificità del 95.8%, mentre l'esame diretto una sensibilità del 10.8% e una specificità del 100%. In particolare per la tubercolosi polmonare la sensibilità della LCR è stata dell' 82% contro il 10.2% dell'esame diretto; mentre per le tubercolosi extrapulmonari del 100% contro il 14.2%.

CONCLUSIONI: La LCR, anche se non può essere considerata "gold standard" diagnostico

e deve in ogni caso essere parte di una attenta e completa valutazione clinico-radiologica, si conferma utilissimo strumento diagnostico, soprattutto per la pronta disponibilità, rispetto all'esame colturale, di una risposta comunque specifica e sensibile.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' ANTIMICROBICA MEDIANTE LA METODICA E-TEST DI HELICOBACTER PYLORI ISOLATI DA BIOPSIE GASTRICHE DI PAZIENTI GIA' SOTTOPOSTI A TRATTAMENTO TERAPEUTICO INEFFICACE

G.Branca¹, G.Cammarota², A. Gasbarrini³, G.B.Gasbarrini², G.Fadda¹

1-Istituto di Microbiologia, 2-Istituto di Medicina Interna, 3-Istituto di Patologia Medica Università Cattolica del Sacro Cuore – Roma

Obiettivo: valutazione della sensibilità *in vitro* a diversi farmaci antimicrobici di ceppi di *Helicobacter pylori* isolati da biopsie gastriche di pazienti sottoposti a più cicli di terapia antimicrobica risultata inefficace.

Metodi: a 18 pazienti sottoposti con insuccesso alla terapia eradicante anti H.p. sono state effettuate biopsie gastriche in corso di endoscopia al fine di valutare la sensibilità ai farmaci antimicrobici di *H. pylori*. Per la coltura ed il saggio di sensibilità ai farmaci sono stati utilizzati Mueller Hinton con aggiunta di sangue di montone al 5% invecchiato di almeno 2 settimane e una sospensione di *H.pylori* con una torbidità pari a 2 Mc Farland. Il metodo prevede una preincubazione in piastra della sospensione batterica in microaerofilia per 4h – 6h a 37°, prima dell'inserimento in piastra delle strisce di E-Test. La lettura del saggio è stata effettuata dopo 3-4 giorni di incubazione in termostato. I farmaci utilizzati sono: Amoxicillina, Claritromicina, Tetraciclina, Levofloxacina e Metronidazolo.

Risultati: nel nostro studio preliminare (Febbraio 2001–Luglio 2001), è stata valutata la sensibilità *in vitro* degli antibiotici usati nelle terapie eradicanti *in vivo*. Tali saggi sono stati effettuati nei confronti di ceppi di *H. pylori* isolati da biopsie gastriche di pazienti sottoposti a più cicli di trattamento terapeutico risultato inefficace. Amoxicillina, Tetraciclina, Levofloxacina, hanno presentato *in vitro* una elevata attività antimicrobica mentre Macrolidi e Metronidazolo una scarsa attività.

Discussione: i nostri risultati possono essere in parte spiegati con il largo impiego di Metronidazolo per infezioni parassitarie, di Macrolidi per infezioni delle vie respiratorie e di entrambi per l'eradicazione di *H. pylori*. Il progressivo aumento della CMI di Macrolidi e Metronidazolo nei confronti dei ceppi saggiati, sottolinea la necessità di porre maggiore attenzione al problema delle resistenze. Dal momento che Metronidazolo e Macrolidi sono frequentemente usati in terapia, la determinazione della sensibilità *in vitro* a tali agenti antimicrobici si rende opportuna almeno per i pazienti che dopo il 1° ciclo di terapia eradicante non rispondono al trattamento empirico.

VALUTAZIONE DELL'ACCURATEZZA DEL PHOENIX™ AUTOMATED MICROBIOLOGY SYSTEM PER L'IDENTIFICAZIONE DI STAPHYLOCOCCUS SPP.

D' Aiuto P, T. Spanu, Ciccaglione D., Leone F., Morandotti G., Fadda G.

Istituto di Microbiologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore – Roma

Obiettivo: Valutare l'accuratezza del Phoenix™ Automated Microbiology System (Becton Dickinson Biosciences, Sparks, MD) per l'identificazione di Staphylococcus spp.

Metodi: Sono stati complessivamente studiati con il Phoenix™ System 263 ceppi di *Staphylococcus* spp., 99 stipiti di *Staphylococcus aureus* e 146 ceppi di *Staphylococcus* spp. coagulasi-negativi isolati negli anni 2000 e 2001 da emocolture di pazienti ricoverati presso il Policlinico Universitario "A. Gemelli".

L'accuratezza del Phoenix™ System per l'identificazione di Staphylococcus spp. è stata determinata confrontando i risultati ottenuti con tale sistema con le identificazioni conseguite con il sistema API (ID 32 STAPH, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Risultati: Il Phoenix™ System ha identificato correttamente a livello di specie 245/263 ceppi (93,1%). In particolare tutti i ceppi di *S. aureus* (99/99), *Staphylococcus capitis* (13/13), *Staphylococcus lugdunensis* (5/5), e la quasi totalità degli stipiti di *Staphylococcus haemolyticus* (36/37), *Staphylococcus hominis* (22/23), *Staphylococcus warneri* (3/4) sono stati correttamente identificati. L'accuratezza del Phoenix™ System per l'identificazione di *Staphylococcus epidermidis* è risultata pari all'83,3% (60/72 ceppi).

Conclusioni: I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che il Phoenix™ Automated Microbiology System sembra identificare con accuratezza numerose specie di stafilococchi che possono essere responsabili di batteriemie e di altre infezioni.

STREPTOCOCCI DI GRUPPO A: IDENTIFICAZIONE DI ALCUNI GENI DI VIRULENZA.

C. Avanzini, G. Volpe, S. Bianco e D. Savoia

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino.

Negli ultimi anni è stato notato un aumento nell'incidenza di infezioni gravi causate da *Streptococcus pyogenes* e ciò è stato attribuito ad un possibile incremento della virulenza batterica legata alla produzione di esotossine che svolgono un ruolo centrale nella patogenesi invasiva.

Al fine di valutare la circolazione di ceppi dotati di particolari caratteri di virulenza, sono stati presi in esame 124 ceppi di *S. pyogenes* isolati da tamponi faringotonsillari effettuati in bambini con forme esclusivamente faringee (96 ceppi) o con esantemi scarlattiniformi (23 ceppi) o provenienti da isolamenti diversi in relazione a patologie invasive (5 ceppi). Su tali ceppi è stata effettuata la ricerca del gene *speA* (esotossina pirogena), del gene *speF* (fattore mitogeno) e del gene *prtF* (proteina F responsabile della penetrazione all'interno delle cellule epiteliali) mediante la tecnica della PCR.

Mentre in tutti i batteri analizzati è stata dimostrata la presenza del gene *speF*, il gene *speA* è risultato presente nel 15% dei ceppi provenienti da casi di faringotonsillite, nel 61% dei ceppi isolati da casi con esantema e nel 100% dei ceppi responsabili di patologie invasive.

La valutazione delle varianti alleliche del gene *speA*, cui può corrispondere una diversa attività di superantigene, effettuata mediante la tecnica dell'SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e del sequenziamento genico, ha rilevato la presenza nei ceppi di tre differenti pattern (*speA1*, *speA2* e *speA3*) e di uno misto (*speA1/3*). L'allele più frequentemente identificato è risultato *speA3* (41%) seguito da *speA1* (28%).

Il gene *prtF* è stato dimostrato nel 36% dei ceppi faringotonsillari; nessuno dei ceppi invasivi è risultato positivo. I ceppi *prtF* negativi sono risultati più sensibili ai macrolidi o, se resistenti, caratterizzati da un fenotipo M, che conferisce resistenza solo ai macrolidi a 14 e 15 atomi di carbonio.

I risultati ottenuti indicano l'importanza di un periodico controllo dei ceppi di *Streptococcus pyogenes* isolati al fine di individuare i fattori batterici responsabili delle patologie più gravi e le caratteristiche dei cloni circolanti.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIBATTERICA DI KANAMICINA SU MICRORGANISMI ISOLATI DA PAZIENTI CON VAGINOSI BATTERICHE POLIMICROBICHE

Leone E., Morandotti G.A. Franco A.A.V, D' Aiuto P., Fadda G.

Istituto di Microbiologia Università Cattolica del Sacro Cuore Roma

Obiettivo: Le vaginiti rappresentano una delle più comuni patologie ginecologiche. Tra queste, la vaginosi batterica è la più frequente. Tale infezione è sostenuta da un'ampia varietà di microrganismi quali *G.vaginalis*, anaerobi e micoplasmi. Molto spesso, tale patologia risulta complicata dalla presenza rilevante di altri microrganismi, quali le *Enterobacteriaceae*. I lattobacilli inoltre risultano assenti o ridotti creando condizioni sfavorevoli ai microrganismi acidofili e acidourici. Nel presente lavoro riportiamo i risultati ottenuti *in vitro* dal confronto di quattro antibiotici utilizzati in clinica per via topica, verso 260 ceppi batterici.

Metodologia: Il nostro studio è stato effettuato su 100 ceppi di *G.vaginalis* e 160 ceppi di *Enterobacteriaceae*. I ceppi batterici sono stati saggiati verso quattro antibiotici: clindamicina, cloramfenicolo, kanamicina e tetraciclina. Il saggio di sensibilità è stato eseguito utilizzando strisce di E-TEST (AB Biodisk, Solna, Sweden).

Risultati: Il 72,3% dei ceppi di *Enterobacteriaceae* risultano sensibili alla kanamicina ad una MIC inferiore a 4 mg/ml. L'attività antibatterica su *G. vaginalis* risulta essere leggermente più bassa, infatti le MIC sono risultate comprese tra 4 e 32 mg/ml. La tetraciclina e il cloramfenicolo mostrano un'attività molto simile su tutti i ceppi di *Enterobacteriaceae*; l'80% di questi ha una MIC compresa fra 1 e 128 mg/ml e il rimanente mostra una MIC \geq a 256 mg/ml. Per *G. vaginalis* le MIC sono comprese fra 0,25 e 8 mg/ml per la tetraciclina e fra 0,125 e 0,5 mg/ml per il cloramfenicolo.

La clindamicina ha dimostrato un'attività contrastante. Infatti è totalmente inefficace verso le *Enterobacteriaceae* mentre è molto attiva verso *G. vaginalis*

Conclusione: Dai nostri risultati risulta che la kanamicina ha una buona attività sulle *Enterobacteriaceae*, superiore a quella degli altri antibiotici saggiati. Su *G.vaginalis* mostra una buona attività, (MIC₅₀ e MIC₉₀ a 12 e 32 mg/ml). Da una nostra indagine epidemiologica, ottenuta analizzando 13.047 secrezioni vaginali di donne in età fertile, 1362 (10.4%) presentavano *G.vaginalis* e di queste 351 (25.7%) erano complicate dalla presenza di *Enterobacteriaceae*

La kanamicina, risulta inoltre essere inattiva verso i lattobacilli e quindi oltre ad avere un'azione antibatterica diretta sui germi responsabili delle vaginosi presenta un'azione indiretta consentendo un più repentino riequilibrio dell'ecosistema vaginale.

CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA DEL VIRUS DELL'EPATITE C MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DIRETTO DEI PRODOTTI DELLA PCR QUANTITATIVA

Gargiulo Franco, De Francesco Maria Atonia, Pinsi Gabriele, Pollara Caterina, Terlenghi Luigina, Perandin Francesca, Manca Nino
Dipartimento di diagnostica di laboratorio – U.O. Virologia ed indagini microbiologiche – Azienda Spedali Civili di Brescia -
Brescia Cattedra di Microbiologia - Università degli Studi di Brescia

Il virus dell'epatite C (HCV) è l'agente responsabile della maggior parte delle epatiti non-A, non-B. La mancanza di un sistema di colture cellulari idoneo per l'isolamento e la caratterizzazione del virus ne ha favorito l'analisi mediante tecniche molecolari quali l'amplificazione genica (RT-PCR) e il sequenziamento del genoma.

Tali studi hanno consentito di individuare una serie di varianti genotipiche del virus caratterizzate dalla proprietà di manifestare una costante similitudine di sequenza nell'ambito dello stesso genotipo, ma una marcata e costante variabilità tra genotipi differenti. I singoli genotipi hanno peculiarità individuali nelle caratteristiche epidemiologiche e nella distribuzione geografica.

La variabilità del genoma, che consente l'inquadramento nosografico dei tipi e sottotipi virali, è responsabile anche di sostituzioni aminoacidiche che alterano, con elevata frequenza, le caratteristiche antigeniche della superficie del virus (quasispecie virali).

Va però sottolineato che mentre la regione codificante per le proteine dell'envelope risulta altamente variabile (Simmonds) quella non codificante (UTR), situata all'estremità 5' del genoma, risulta essere molto più conservata, anche rispetto alla regione codificante per le proteine del core. E' questo il motivo per cui l'estremità 5' del genoma risulta essere quella più frequentemente analizzata per l'identificazione del genotipo virale.

Con l'intento di produrre un test che consentisse di pervenire alla caratterizzazione dei tipi e sottotipi virali con una specificità pari a quella della maggior parte dei prodotti del commercio ma con una notevole riduzione dei costi e di associare due indagini (viremia e genotipo) molto importanti per la valutazione clinica e terapeutica del paziente, abbiamo messo a punto il sequenziamento diretto della regione 5' UTR da prodotti della PCR quantitativa. Con tale indagine abbiamo ottenuto una elevata specificità diagnostica anche nei confronti dei genotipi misti, nonostante la ridotta sensibilità (necessità di una viremia > 70000 U.I./ML) legata alla preparazione tecnica del campione per il sequenziamento diretto.

Il presente studio si propone la comparazione del nostro test con quello di ibridazione più diffusamente impiegato per la genotipizzazione del virus dell'epatite C (INNO-LiPA HCV II - INNOGENETICS), particolarmente per quanto concerne le caratteristiche diagnostiche, tecniche ed economiche sulla base dei risultati ottenuti in un anno di applicazione routinaria dei due test impiegati in associazione per l'analisi di 1200 campioni clinici.

VALUTAZIONE DI BD PROBE TEC ET NELLA RICERCA DIRETTA DI M.TUBERCULOSIS COMPLEX IN CAMPIONI BIOLOGICI DI PROVENIENZA RESPIRATORIA.

Pinsi G., Signorini C., Gelmi M., Gargiulo F., Reghenzi P., Manca N.
Dipartimento di diagnostica di laboratorio – U.O. Virologia ed indagini microbiologiche – Azienda Spedali Civili di Brescia -
Brescia Cattedra di Microbiologia – Università degli Studi di Brescia

Introduzione

La diagnosi di certezza di tubercolosi richiede isolamento in coltura e l'identificazione di *M. tuberculosis* dai campioni biologici. I metodi colturali, anche quelli che si avvalgono dei più recenti terreni liquidi, radiometrici e non, richiedono, per mettere in evidenza la presenza di *M. tuberculosis* nel campione un tempo spesso lungo (mediamente 12-14 giorni).

Negli ultimi anni la biologia molecolare ha fornito nuove metodiche in grado di amplificare specifiche regioni del DNA o RNA dei micobatteri direttamente nel materiale patologico in poche ore. Abbiamo quindi voluto verificare l'utilità di un nuovo saggio, il BD Probe Tec (Becton Dickinson). Questo utilizza per la rivelazione qualitativa diretta del DNA del complesso *M. tuberculosis* la tecnologia Strand Displacement Amplification (SDA).

Materiali e Metodi

Nel periodo Novembre 2000 – Aprile 2001, su 116 campioni provenienti dall'apparato respiratorio è stato eseguito oltre l'esame microscopico e la coltura per la ricerca dei micobatteri, anche la ricerca diretta dell'*M. tuberculosis* utilizzando questo nuovo metodo. I campioni sono stati scelti in base alla positività dell'esame microscopico o alla provenienza da pazienti con forte sospetto di tubercolosi. Tutti i campioni sono stati pretrattati con metodo NALC/NaOH. Il test di amplificazione è stato eseguito secondo le istruzioni d'uso.

Risultati e discussione

Dei 116 campioni biologici considerati, 42 hanno presentato una coltura positiva per *M. tuberculosis* e 2 per *M. avium*. Tra i 42 campioni con coltura positiva per *M. tuberculosis*, 39 hanno presentato il test Probe Tec positivo. La sensibilità del test è stata quindi pari al 92,8%, la specificità pari al 100%. Più in particolare, nei casi con diretto positivo / coltura positiva (29 casi) il test è risultato sempre positivo, sensibilità e specificità sono state pari al 100%. Nei 13 casi nei quali si è avuto la coltura positiva con microscopia negativa, il Probe Tec è risultato positivo in 10. In questo gruppo di campioni, diretto negativo – coltura positiva, sensibilità e specificità sono state rispettivamente quindi pari a 76,9% e 100%. Vi è stato un caso di coltura negativa con test Probe Tec positivo. Si trattava di un paziente extracomunitario nel quale era stata intrapresa una terapia antitubercolare *ex adjuvantibus* da circa quindici giorni, in attesa della broncoscopia.

La metodica si è rivelata di semplice esecuzione e rapida. La fase di amplificazione e di rivelazione si svolge contemporaneamente in modo del tutto automatico e in breve tempo (1 ora). Ciò consente di effettuare il test eventualmente anche più di una volta alla settimana. La presenza di un controllo interno di amplificazione in ogni pozzetto, consente di evidenziare l'eventuale presenza di inibitori della reazione.

I nostri dati sembrano quindi suggerire che il sistema BD Probe Tec Et è un saggio attendibile per la rilevazione diretta di *M. tuberculosis* in campioni clinici di provenienza respiratoria.

METODICHE IN VITRO ED IN VIVO PER L'ISOLAMENTO E LA RIATTIVAZIONE DI FORME VBNC DI CAMPYLOBACTER

Baffone W.*, Citterio B.*, Casaroli A*., Campana R.*, Pierfelici L.*, Donelli G**

*Istituto Scienze Tossicologiche Igienistiche Ambientali-Università Urbino **Istituto Superiore di Sanità, Roma

I *Campylobacter* possono essere presenti nelle acque in forme "sub-letally injured" o in uno stato vitale non coltivabile (VBNC), caratterizzati da incapacità di crescita a 42°C e aumentata sensibilità agli antimicrobici, per cui il loro isolamento richiede particolari condizioni colturali. Ceppi di *C. jejuni* (*C. jejuni* ATCC 33291 e *C. jejuni* 224) sono stati coltivati a 4°C e 28°C in un sistema predisposto per simulare le condizioni naturali di induzione delle forme coccoidi non coltivabili. In tale microcosmo sono state monitorate la vitalità e l'attività respiratoria microbica ad intervalli di tre giorni per un periodo di circa 30 giorni mediante la colorazione con CTC-DAPI e CTC- anticorpo policlonale coniugato con FITC; la coltivabilità dei batteri è stata invece valutata mediante conta su piastra fino al 15° giorno di incubazione. Per l'isolamento dei batteri in stato VBNC sono stati confrontati tre diversi brodi di arricchimento contenenti varie combinazioni di antibiotici con successiva semina su terreni agarizzati. Non sono state tuttavia evidenziate differenze sostanziali fra i sistemi di arricchimento impiegati, che hanno permesso solo un modesto prolungamento fino a 20–22 giorni della fase di coltivabilità su terreno solido. La riconversione della forma VBNC a quella vegetativa è stata ottenuta in due modelli sperimentali "in vivo": a) infettando per via intragastrica con brodocolture concentrate topi Balb C per valutare la colonizzazione del tratto intestinale e b) inoculando la stessa sospensione batterica nell'intestino di ratto (modello RIL) per la valutazione dell'accumulo di fluido (ml/cm di intestino). Per ottenere l'isolamento batterico è stato quindi effettuato l'esame colturale degli intestini di topo e del fluido prelevato dalle anse ileali di ratto. Entrambi i modelli animali hanno reso possibile la riattivazione delle forme coccoidi non coltivabili dei ceppi in esame.

Il presente lavoro è stato effettuato con finanziamenti MIUR e PRIN 2000

INFEZIONI ASSOCIATE A CATATERI VENOSI CENTRALI E SEPSI CORRELATE: RISULTATI RELATIVI A TRE ANNI DI OSSERVAZIONE

N.Spagnolo, F.Leone, P.Mazzella, T.D'Inzeo, G.A. Morandotti, A.Rossi, G.Donelli*, G.Fadda.

Istituto di Microbiologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

*Laboratorio di ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

INTRODUZIONE: Le complicanze più frequentemente osservate, dovute all'uso di cateteri venosi centrali, sono quelle infettive e tra queste le sepsi CVC-relate; inoltre studi ultrastrutturali della parete di alcuni CVC infetti e non (vedi poster A.Rossi et al.) avvalorano l'ipotesi di fattori predisponenti la colonizzazione di alcuni microrganismi. Scopo del nostro studio è stato quello di definire la frequenza, l'eziologia e i fattori predisponenti l'insorgenza di infezioni associate a cateteri venosi e di sepsi correlate in pazienti ricoverati presso il Policlinico Universitario A.Gemelli di Roma durante il periodo 1998/2000.

RISULTATI: nel periodo 1998/2000 abbiamo analizzato 3261 cateteri dei quali 1245 sono risultati infetti (38.1%). In 249 casi (20%) è stato isolato lo stesso microrganismo sia dal CVC che dal sangue. Per quanto riguarda l'eziologia degli episodi di sepsi, *S.epidermidis*, *S. aureus* e *Candida spp.* sono risultati essere gli agenti più frequentemente responsabili; in particolare, *S. epidermidis* è risultato implicato in 103 casi (41%), *S.aureus* in 30 casi (12%) e *Candida spp.* in 50 casi (20%). Inoltre i nostri risultati identificano nei reparti di Rianimazione, Ematologia, Trapianti d'organo e Cardiochirurgia quelli con la più alta incidenza di infezioni associate all'uso di tali dispositivi; pur avendo rilevato nel corso dei tre anni di osservazione sia una progressiva riduzione percentuale di infezioni da CVC su un numero costante di cateteri esaminati (1998, 42.2%; 1999, 38.2%; 2000, 33.9%) che una riduzione delle sepsi CVC-relate

CONCLUSIONI: Le complicanze di carattere infettivo rappresentano una delle maggiori limitazioni all'impiego dei cateteri vascolari. L'instaurarsi di una colonizzazione batterica o fungina può comportare in particolari categorie di pazienti sepsi CVC-relate. Dai nostri dati risulta che queste infezioni, spesso si risolvono con la rimozione del catetere o con una terapia antibiotica mirata. Inoltre è ipotizzabile che un sistema di sorveglianza sulle infezioni nosocomiali, razionalizzando le procedure diagnostico-terapeutiche abbia indirettamente determinato una riduzione delle sepsi correlate a CVC.

ATTIVITÀ TERAPEUTICA DI UN MIMOTOPO KILLER SINTETICO NEI CONFRONTI DI CANDIDOSI SISTEMICHE E VAGINALI SPERIMENTALI.

Magliani Walter, Bracci Luisa*, Lozzi Luisa*, Neri Paolo*, De Bernardis Flavia**, Cassone Antonio**, Conti Stefania, Polonelli Luciano

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università di Parma.

*Sezione di Chimica Biologica, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena

**Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Un mimotopo killer, sintetizzato quale decapeptide (SKM) sulla base della sequenza della regione variabile di un anticorpo anti-idiotipico ricombinante a singolo filamento rappresentante l'immagine interna di una tossina killer di lievito caratterizzata da un ampio spettro di attività microbica, è stato utilizzato per il trattamento terapeutico di candidosi vaginali e sistemiche sperimentali. La somministrazione di SKM successiva all'inoculo con *Candida albicans* si è dimostrata efficace nell'eradicazione dell'infezione, nelle stesse condizioni sperimentali, quanto un trattamento completo con fluconazolo. Tutti gli animali trattati con SKM risultavano indenni dall'infezione dopo due settimane, mentre il 100% di quelli trattati con un decapeptide sintetico irrilevante di controllo risultavano ancora infetti. Somministrato per via sistemica a topi preventivamente infettati con un inoculo letale di *C. albicans*, SKM determinava un prolungamento estremamente significativo del tempo mediano di sopravvivenza (anche oltre 60 giorni), in comparazione ad animali di controllo non trattati o trattati con il decapeptide irrilevante. Mediante alanine-scanning sono stati, inoltre, ottenuti peptidi modificati che mostravano *in vitro* una implementata attività candidacida. Mimotopi sintetici decapeptidici, pertanto, possono mantenere l'attività biologica dell'anticorpo ricombinante microbica da cui sono derivati, rappresentando nuovi potenziali agenti terapeutici nei confronti di infezioni mucosali e sistemiche sostenute da importanti microrganismi patogeni.

MODULAZIONE DELLO STATO OSSIDO-RIDUTTIVO INTRACELLULARE: STRUMENTO PER NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI ANTIVIRALI?

¹A.T. Palamara, ²L. Nencioni, ²A. Iuvara, ²L. Hernandez and ²E. Garaci.

¹Fac. Farmacia Univ. Roma "La Sapienza"; ²Dip. Med. Sper. Univ. Roma "Tor Vergata"

La patogenesi delle malattie ad eziologia virale è determinata da un gran numero di fattori dipendenti sia dall'agente infettante sia dalla cellula ospite e dalla sua capacità di attivare/inibire specifiche vie metaboliche. In questo contesto, il ruolo chiave dello stato ossido-riduttivo (redox) intracellulare, nel controllo della replicazione virale, è stato ampiamente dimostrato. Infatti, molte sostanze antiossidanti sono in grado di inibire la replicazione di diversi virus (parainfluenza, Herpes Simplex, HIV). Ad oggi, comunque, molte interazioni tra stato redox e proteine cellulari "redox-sensibili" coinvolte nell'infezione, restano da definire. Tra queste, particolare importanza è stata attribuita alla proteina anti-apoptotica Bcl-2, la cui espressione è stata associata a fenomeni di persistenza virale. A partire da tali presupposti, la nostra ricerca è stata volta allo studio dei rapporti tra stato redox intracellulare ed espressione di Bcl-2 nella replicazione del virus influenzale.

A questo scopo, sono state utilizzate linee cellulari dotate di un diverso grado di espressione di Bcl-2. Come controllo, è stato utilizzato un costrutto codificante per la proteina wild-type. I risultati ottenuti mostrano che l'espressione, forzata o costitutiva di Bcl-2, è correlata ad uno stato redox intracellulare più riducente, dimostrabile come incremento dei livelli di glutatione ridotto (GSH), rispetto ad una popolazione cellulare di controllo. Inoltre, in cellule con elevata espressione di Bcl-2, la replicazione del virus influenzale risulta essere fortemente inibita (98% di riduzione del titolo virale) rispetto a cellule pienamente permissive che non esprimono Bcl-2. L'analisi delle proteine virali, mediante western blot, dimostra che tale inibizione non è completamente riconducibile ad un blocco trascrizionale-traduzionale. Infatti, l'espressione delle proteine virali, nelle cellule ad alto contenuto di Bcl-2/GSH, risulta ridotta, ma solo parzialmente rispetto alle cellule di controllo, suggerendo il concorso di meccanismi diversi nel blocco della replicazione virale. A conferma di questa ipotesi, l'analisi in immunofluorescenza, rivela alterazioni a carico del traffico intracellulare della nucleoproteina (NP) che, nelle cellule in cui la proteina Bcl-2 è maggiormente espressa, viene trattenuta nel nucleo. Tali dati indicano una stretta correlazione tra espressione di Bcl-2 e stato redox intracellulare, suggerendo nuovi target molecolari per il controllo della replicazione del virus influenzale.

DIAGNOSI MOLECOLARE DI HPV IN LESIONI GENITALI : TIPIZZAZIONE IN BASE A DIFFERENTI REGIONI GENOMICHE.

Anna Marta Degener e Ferdinando Dianzani*

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Sezione di Virologia, Università "La Sapienza", Roma

*Sezione di Virologia, Università Campus Biomedico, Roma.

Il cancro della cervice occupa ancora oggi il secondo posto fra i tumori che più frequentemente colpiscono le donne in tutto il mondo ed ormai numerosi studi hanno confermato la stretta associazione tra l'infezione da Papillomavirus umani (HPV) e cancro genitale. Fino ad oggi sono stati identificati più di 80 distinti genotipi di HPV e fra questi all'incirca 45 sono stati ritrovati nelle mucose genitali. Anche se gli HPV 16 e 18 sono considerati ad alto rischio di trasformazione perché prevalentemente associati a lesioni cancerose o pre-cancerose, numerosi altri tipi sono stati ritrovati recentemente in lesioni maligne o pre-maligne. La diffusione nella popolazione ed il ruolo patologico di questi virus non è stato ancora ben definito. A questo scopo, l'utilizzo di diverse metodiche di PCR in grado di amplificare differenti porzioni di DNA genomico degli HPV può offrire un valido contributo per chiarire non solo la distribuzione, ma anche il potenziale oncogeno dei diversi tipi circolanti.

Di questo argomento ci siamo occupati nel corso degli ultimi anni. In particolare, l'impiego di PCR in grado di amplificare regioni precoci (E1) o tardive (L1) consente sia di diagnosticare precocemente la presenza del virus, sia di individuare nuovi genotipi. Nella popolazione studiata, costituita, in prevalenza, da donne con lesioni intraepiteliali di basso grado, sono stati identificati tipi di HPV che precedentemente non venivano rilevati. Recentemente la messa a punto di primer degenerati in grado di individuare 36 genotipi diversi mediante l'amplificazione dell'intero gene E6 e della porzione N-terminale di E7 (T. Sagagawa *et al.* Virus Research, 67, (2000)), ci ha consentito di identificare anche quei ceppi che, integrandosi nella regione tardiva, potevano sfuggire all'indagine virologica e, soprattutto, con l'analisi mediante sequenziamento dei prodotti di PCR ottenuti, è possibile valutare la capacità trasformante delle proteine oncogene virali E6 ed E7. Questo tipo di indagine riveste particolare importanza per quanto riguarda il problema del trattamento di pazienti che presentano lesione pre-maligne associate ad HPV e per determinare una classificazione clinico-patologica degli HPV.

MUTAZIONI ASSOCIATE ALLA RESISTENZA ALLA STREPTOMICINA IN CEPPI DI *M. TUBERCULOSIS* ISOLATI IN ITALIA

VICIDOMINI, S.,¹ ORRU', G.,¹ IONA, E.,² OGGIONI, M.R.,¹ FATTORINI, L.,² OREFICI, G.² e POZZI, G.¹

¹ Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Dip. Biologia Molecolare, Università' di Siena e ² Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

La streptomina, farmaco antitubercolare di prima scelta, è un aminoglicoside, interagisce con la subunità ribosomiale 30S ed ha effetti multipli di inibizione sulla sintesi proteica. Questo farmaco è, infatti, in grado di interferire con l'iniziazione della sintesi del polipeptide nonché nella correzione ribosomiale. Numerosi studi hanno dimostrato che mutazioni puntiformi nel codone 43 (AAG→AGG) o nel codone 88 (AAG→ACG, AAG→CAG) del gene che codifica per la proteina S12 (*rpsL*) sono in grado di indurre resistenza alla streptomina in *M. tuberculosis*. Un altro gene implicato nella resistenza alla streptomina è *rrs* il quale codifica il 16S rRNA: all'interno di questo gene, sono state riscontrate nel loop 530 alcune mutazioni puntiformi associate a resistenza alla streptomina.

In questo lavoro 40 campioni di *M. tuberculosis* SM-resistenti provenienti da ospedali del Centro e Nord Italia (Ancona, Firenze, Roma) sono stati studiati nei geni *rpsL* e *rrs*. I frammenti, rispettivamente, di 308 bp (nn 11963-12270, GenBank Accession no. AL021943) e 530 bp (nn 1067-1569, GenBank Accession no. X58890) sono stati analizzati in Real Time PCR mediante l'utilizzo di tre sonde fluorescenti. I frammenti sono stati successivamente sequenziati per evidenziare altre mutazioni non rilevabili con questa metodica.

L'analisi del gene *rpsL* ha mostrato mutazioni in 8 dei 40 campioni: di questi, tre con MIC=128 mg/ml presentavano la stessa mutazione puntiforme nel codone 43 (AAG→AGG); altri quattro, con MIC compresa tra 8 e 128 mg/ml, mostravano una mutazione nel codone 88 (AAG→ACG o AAG→CAG); in un solo campione è stata riscontrata una mutazione nel codone 105 (CAG→CAA). Nel gene *rrs* soltanto tre dei 40 campioni SM-resistenti con MIC compresa tra 8 e 128 mg/ml erano mutati nel loop 530. In totale soltanto il 27.5% (11 su 40) dei ceppi SM-resistenti presentava mutazioni nei codoni 43 e 88 del gene *rpsL* o nel loop 530 di *rrs*: questo implica che oltre il 70% delle mutazioni sono da ricercarsi in altre regioni finora non descritte in letteratura.

Quattro alleli del gene *rpsL* sono stati depositati in GenBank con i seguenti Accession Number: AF398879, AF398880, AF398881, AF398882 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

“DELIVERY” VAGINALE DI MICROBICIDI ANTI-HIV PER MEZZO DI BATTERI COMMENSALI: ESPRESSIONE DELLA CIANOVIRINA-N IN *STREPTOCOCCUS GORDONII*

B. Giomarelli, R. Proveddi, F. Meacci, T. Maggi, D. Medaglini, G. Pozzi.

Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Policlinico Le Scotte, Siena.

Per valutare la possibilità di utilizzare batteri commensali ricombinanti per il “delivery” vaginale di microbici capaci di inattivare il virus HIV, sono stati costruiti dei ceppi di *Streptococcus gordonii* che esprimono la cianovirina-N (CV-N), una proteina di 101 aminoacidi isolata dal cianobatterio *Nostoc ellipsosporum*. CV-N è in grado di inattivare, anche a concentrazioni nanomolari, sia i ceppi di laboratorio studiati che una grande varietà di isolati clinici primari di HIV-1, HIV-2, SIV e FIV.

I batteri ricombinanti che esprimono la CV-N sono stati costruiti utilizzando il sistema ospite-vettore per l'espressione di proteine eterologhe in *S. gordonii*, messo a punto nel nostro laboratorio. La CV-N è stata espressa in *S. gordonii* sia in forma ancorata alla superficie batterica, che come proteina secreta, utilizzando come partner di fusione la proteina streptococcica M6. Entrambe le fusioni costruite includono i primi 122 aa N-terminali di M6 e, nella forma ancorata anche 140 aa C-terminali di M6. L'espressione delle fusioni CV-N/M6 nei ceppi ricombinanti è stata saggiata sia mediante Western blot delle frazioni cellulari e del sovrantante della coltura batterica, sia mediante analisi citofluorimetrica, utilizzando un anticorpo anti-CV-N.

La forma ricombinante secreta della CV-N si è dimostrata capace di legare la gp120 di HIV-1 in saggi ELISA. La CV-N espressa sulla superficie batterica è risultata invece capace di legare efficientemente i virioni in un saggio di cattura di HIV-1 *in vitro*.

Questi dati mostrano che la CV-N è stata espressa in *S. gordonii* in forma biologicamente attiva e rappresentano quindi un primo passo nello sviluppo di un sistema di “delivery” vaginale di microbici anti-HIV per mezzo di batteri commensali. Sviluppi successivi di questo progetto includeranno l'espressione della CV-N in ceppi di *Lactobacillus* isolati dalla vagina umana e la verifica *in vivo* dell'attività biologica della CV-N in un modello di colonizzazione della vagina murina da parte dei batteri ricombinanti.

Questo lavoro è stato svolto in collaborazione con il laboratorio del Prof. Michael Boyd (NCI-Frederick, Maryland, USA), il quale ha identificato e caratterizzato la CV-N (Boyd M. *et al.*, 1997).

BATTERI PATOGENI RESPONSABILI DI MALATTIE A TRASMISSIONE IDRICA: STUDIO MEDIANTE SAGGI CULTURALI E MOLECOLARI DELLA LORO PERSISTENZA NELL'AMBIENTE ACQUATICO IN FORMA VITALE MA NON COLTIVABILE E IN ASSOCIAZIONE AL PLANCTON.

Baffone W.¹, Canepari P.², Carli A.³, Cellini L.⁴, Fera M.T.⁵, Pompei R.⁶, Pruzzo C.⁷, Rappelli P.⁸.

*Ist. Scienze Tossicologiche, Igienistiche e Ambientali, Università di Urbino*¹, *Dip. Patologia, Università di Verona*², *Dip. Biologia Sperimentale, Ambientale e Applicata, Università di Genova*³, *Dip. Scienze Biomediche, Università di Chieti*⁴, *Ist. Microbiologia, Università di Messina*⁵, *Dip. Scienze Mediche Internistiche “M. Aresu”, Università di Cagliari*⁶, *Ist. Microbiologia, Università di Ancona*⁷, *Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari*⁸

L'acqua rappresenta una via molto efficiente di trasmissione di malattie infettive a carico, primariamente, del tratto gastro-intestinale. Negli ultimi anni i saggi tradizionali utilizzati per il controllo microbiologico delle acque sono stati oggetto di critiche per la loro presunta inadeguatezza alla tutela della salute dell'uomo. Una critica deriva dalla recente dimostrazione dell'esistenza dello stato “vitale ma non coltivabile (VBNC)”, una strategia sviluppata dai batteri eutrofi per sopravvivere in condizioni non favorevoli. Inoltre dati recenti indicano che gli organismi del plancton presentano una cospicua popolazione microbica adesa e possono fungere da serbatoio di batteri patogeni. Il presente lavoro si inquadra in tale problematica e si riferisce alla ricerca svolta dalle U.R. afferenti al Programma di Ricerca Scientifica di Rilevante Interesse Nazionale Cofin2000 “Batteri patogeni responsabili di malattie a trasmissione idrica: studio mediante saggi culturali e molecolari della loro persistenza nell'ambiente acquatico in forma vitale ma non coltivabile e in associazione al plancton”. Tra le tematiche affrontate è incluso lo studio di queste due importanti strategie di sopravvivenza mediante il confronto, in una indagine della durata complessiva di 18 mesi, dei batteri patogeni e degli indicatori di inquinamento fecale coltivabili ed in stato VBNC che sono presenti in campioni di acqua e plancton raccolti nei mari Adriatico, Ionio, Tirreno, Ligure e nel Lago di Garda. Un aspetto non marginale del lavoro riguarda la messa a punto di nuovi saggi per la determinazione della qualità microbiologica delle acque che, basandosi su tecniche della biologia molecolare, permettono di valutare in modo accurato e realistico la carica microbica di patogeni e di indicatori. Nel poster vengono presentati i risultati più significativi che sono stati ottenuti durante il primo anno di attività delle diverse U.R. afferenti al Programma.

STUDIO DELL'ATTIVITÀ *IN VITRO* DI UNA NUOVA MOLECOLA, IL SULFIMIDAZOLO, SU CEPPI DI *T. VAGINALIS*.

C.Casolari*, M.Malagoli°, T.Rossi°, A.Baggio°, M.Castelli°.

*Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche.

°Dipartimento di Scienze Biomediche.

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia.

Trichomonas vaginalis è un parassita ubiquitario responsabile di infezioni localizzate alle mucose genitali in entrambi i sessi con manifestazioni cliniche rappresentate nella donna da vulvovaginite e nell'uomo da uretrite e/o prostatite. Il meccanismo patogenetico sembra almeno in parte legato alla riduzione della normale popolazione microbica vaginale con alterazione dei valori di pH e conseguente colonizzazione di microrganismi che concorrono a sostenere la sintomatologia clinica. L'efficacia della terapia è legata pertanto alla associazione di farmaci attivi oltre che sul protozoo anche su altri agenti eventualmente implicati. I farmaci tricomonici solitamente impiegati sono i 5-nitroimidazoli come il metronidazolo (MZ) attivo anche sui batteri anaerobi ma totalmente inefficace sulle specie aerobie. Nel presente studio è stata valutata *in vitro* l'attività di una nuova molecola, il sulfimidazolo (1-metil-2-[(4-aminofenil)-sulfonil]-amino-5-nitroimidazolo)(SIZ), che riunisce nella sua struttura due diversi gruppi funzionali: quello dei sulfonamidici e quello dei 5-nitroimidazoli. In tale composto viene mantenuta la relazione struttura-attività con uno spettro antimicrobico notevolmente ampliato rispetto a quello delle singole sostanze. Considerata la duplice attività di SIZ sui microrganismi sia aerobi che anaerobi, si è pensato di verificarne l'azione anche sui protozoi e in particolare su *Trichomonas* confrontandone l'attività con quella di MZ. Si è proceduto pertanto alla determinazione delle MIC sia per SIZ che per MZ su 12 ceppi di *T.vaginalis* d'isolamento clinico. In 8 dei 12 isolati sono state registrate MIC di MZ pari a $0.5 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$. Nei rimanenti 4 ceppi le MIC di MZ hanno prodotto mediamente valori 100 volte superiori ($>50 \mu\text{g/ml}$) esprimendo pertanto resistenza. Il confronto con le MIC ottenute con SIZ ha dimostrato una attività analoga a quella di MZ nei riguardi dei ceppi sensibili, mentre nei riguardi degli isolati MZ-resistenti SIZ è risultato più attivo con MIC di $10 \mu\text{g/ml} \pm 0.3$. In conclusione, il sulfimidazolo sembra possedere su *Trichomonas* una attività migliore rispetto al metronidazolo, farmaco di riferimento, associando una attività antibatterica sui germi aerobi che MZ non possiede. Queste caratteristiche potrebbero motivare un interesse per questo nuovo composto nel trattamento della tricomoniasi e delle eventuali infezioni batteriche concomitanti.

MONITORAGGIO DELLE INFEZIONI E DELLE FARMACORESISTENZE NEL CENTRO TRAPIANTI DI GENOVA

Campanella Maria Paola*, Soro Ornella#, Mannelli Stefania#, Vincentelli Mario^x, Varnier Oliviero E*#.

*Sezione di Microbiologia, DISCAT, Università; #U.O. Microbiologia Clinica, Osp. S. Martino; e ^xPCB Engineers & Partners, Genova/Milano.

Il controllo delle infezioni ospedaliere prevede un'attività di sorveglianza nel tempo dei microrganismi patogeni e delle relative farmacoresistenze.

È stato implementato uno strumento informatico che permette di analizzare tutti i referti eseguiti (circa 170.000 esami dal gennaio 1998 al settembre 2001) e rende disponibile, su interrogazioni articolate per vari parametri, le informazioni richieste. Ad esempio, l'interrogazione consentirà di avere l'informazione sul numero totale dei microrganismi isolati, la distribuzione nel tempo, il tipo di campioni, i reparti di provenienza, le percentuali di resistenza, ecc.

In questo studio preliminare è stato prelevato un sottoinsieme di 26,170 esami effettuati dall'1 gennaio 1998 al 21 settembre 2001 su campioni provenienti dal Centro Trapianti d'Organo dell'Ospedale San Martino. L'interrogazione è stata ristretta inserendo la presenza di patogeni "sentinella", quali stafilococchi meticillino-resistenti (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *KES* e altri bacilli gram-negativi resistenti, pneumococchi penicillino- ed eritromicino-resistenti, entero-cocchi resistenti alla vancomicina (VRE), *M. tuberculosis* multiresistente (MDR), funghi, ecc. All'interno di questa selezione sono stati identificati alcuni microrganismi con elevata frequenza di presentazione; in particolare sono stati isolati 822 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*, provenienti da diversi materiali. È stata infine riportata, sia in maniera tabellare che grafica, la rappresentazione temporale della risposta alla terapia analizzando le resistenze ai 11 antibiotici. Si è evidenziato il seguente andamento percentuale delle resistenze: carbenicillina 70-75%, tazobactam 40-50%, cefotaxime 90-95%, ceftazidime 40-45%, cefepime 20-25%, aztreonam 70-75%, imipenem 35-40%, gentamicina 45-55%, amikacina 35-45%, ciprofloxacina 45-55%, e fosfomicina 30-40%.

Verranno effettuate altre interrogazioni allo scopo di identificare un flusso di informazioni che in tempi preordinati (mensilmente) arrivino al Centro Trapianti. L'analisi dei dati clinici, ottenuti con alcune semplici operazioni effettuate tramite il software realizzato, suggerisce che le informazioni microbiologiche ottenute dagli esami refertati possano essere utilizzate per un ottimale management del paziente in un Centro Trapianti.

VACCINO A DNA CONTRO LA PORINA F (OPRF) DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

M.R. Catania, S. Metafora, F. Morelli, S. Concilio, F. Gallè, L. Ortega De Luna, F. Rossano.

Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Dip. Medicina Sperimentale, Seconda Università degli Studi di Napoli. CNR, Napoli.

Pseudomonas aeruginosa è un patogeno opportunisto Gram-negativo, agente eziologico di infezioni nosocomiali in pazienti debilitati o immunodepressi. Importante è il ruolo di questo batterio nelle pneumopatie in casi di fibrosi cistica, malattia genetica ad esito infausto.

La notevole frequenza d'isolamento di ceppi di *P. aeruginosa* resistenti agli antibiotici, ha fatto convergere l'attenzione sulla possibilità di approntare un vaccino che conferisca una sufficiente immunoprotezione. Tentativi effettuati con cellule intere uccise (1), preparazioni di proteine purificate (2), proteine di fusione (3) o peptidi sintetici (4), hanno determinato una discreta immunoprotezione. Negli ultimi anni si è dimostrato valido un sistema di vaccinazione basato sull'utilizzo della sequenza genica dell'antigene. Il costrutto di acido nucleico viene somministrato attraverso un vettore retrovirale, incapsulato in lisosomi o come DNA nudo (DNA plasmidico) iniettato nel muscolo scheletrico.

Il nostro gruppo, che da anni si occupa delle attività immunobiologiche delle proteine della membrana esterna, ha indagato la possibilità di costruire un vaccino a DNA con il gene della porina F (OprF) di *Pseudomonas aeruginosa*.

1) Cripps AW, Dunkley ML, Clancy RL. *Mucosal and systemic immunizations with killed Pseudomonas aeruginosa protect against acute respiratory infection in rats.* Infect Immun 1994; 62(4):1427-36

2) Lee N, Ahn B, Jung SB, Kim YG, Kim H, Park WJ. *Conformation-dependent antibody response to Pseudomonas aeruginosa outer membrane proteins induced by immunization in humans.* FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 27: 79-85

3) Mansouri E, Gabelsberger J, Knapp B, Hundt E, Lenz U, Hungerer KD, Gilleland H E Jr, Staczek J, Domdey H, von Specht BU. *Safety and immunogenicity of a Pseudomonas aeruginosa hybrid outer membrane protein F-I vaccine in human volunteers.* Infect Immun 1999; 67: 1461-1470

4) Gilleland HE Jr, Gilleland L B, Staczek J, Harty RN, Garcia-Sastre A, Palase P, Brennan FR, Hamilton WDO, Bendahmane M, Beachy RN. *Chimeric animal and plant viruses expressing epitopes of outer membrane protein F as a combined vaccine against Pseudomonas aeruginosa lung infection.* FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 27: 291-297.

P53 E ANTICORPI ANTI-P53 NEL FOLLOW-UP DELLE INFEZIONI GASTRICHE DA *HELICOBACTER PYLORI*.

Catania M.R., Ortega De Luna L., Gallè F., Concilio S., Rossano F.

Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Dip. Medicina Sperimentale, Seconda Università degli Studi di Napoli.

Helicobacter pylori è un noto cancerogeno che esercita la propria azione sulla mucosa gastrica (1). La presenza della proteina p53 e degli anticorpi rivolti contro di essa è stata osservata da molti Autori in pazienti affetti da cancro (2, 3, 4).

Il nostro studio è stato condotto su 117 pazienti sottoposti ad endoscopia diagnostica. La presenza della proteina p53 mutante nelle biopsie e degli anticorpi anti-p53 nel siero è stata determinata in pazienti con infezione cronica da *H. pylori*. Ci è sembrato interessante il tentativo di sviluppare un test che possa essere utilizzato nella prevenzione del cancro gastrico. Dai risultati ottenuti, pur essendo questa ipotesi attraente, la possibilità di prevenire il cancro gastrico con la tecnica usata non sembra attualmente realistica.

Tuttavia, in pazienti infetti da *H. pylori* con alti livelli di proteina p53 e/o di anticorpi anti-p53, l'eradicazione antibiotica dell'infezione ha portato ad una rilevante diminuzione dei markers suddetti.

E' quindi possibile ipotizzare che una corretta terapia contro *H. pylori* possa ridurre il rischio di sviluppo del cancro gastrico.

BIBLIOGRAFIA

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori.* IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994, pp. 1-241.
2. Coomber DW, Ward RL *Isolation of human antibodies against the central DNA binding domain of p53 from an individual with colorectal cancer using antibody phage display.* Clin Cancer Res 2001; 7(9):2802-8.
3. Sitruk V, Vaysse J, Chevret S, Ganne-Carrie N, Christidis C, Trinchet J, Beaugrand M *Prevalence and prognostic value of serum anti-p53 antibodies in hepatocellular carcinoma. A study of 159 patients.* Gastroenterol Clin Biol 2000; 24(12):1159-63.
4. Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T *Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma.* Cancer 2000;15;89(8):1677-83

RICERCA DI *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* NELLE CELLULE MONONUCLEATE DEL SANGUE PERIFERICO: POSSIBILE APPLICAZIONE NELLE INFEZIONI VASCOLARI

R. Sessa, M. Di Pietro, G. Schiavoni, I. Santino, F. Benedetti-Valentini*, R. Perna*, M. del Piano

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica "G. Sanarelli" - I^a Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Roma "La Sapienza"

*Dipartimento di Chirurgia Vascolare - I^a Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Roma "La Sapienza"

Recentemente la *Chlamydia pneumoniae* è stata associata a malattie croniche quali sclerosi multipla, sindrome di Alzheimer, cancro polmonare, ischemia cerebrale e cardiopatia ischemica.

Il ruolo della *C. pneumoniae* nella cardiopatia ischemica, quindi nell'aterosclerosi, è stato studiato mediante quattro campi di ricerca e precisamente con studi sieroepidemiologici, ricerca diretta del microrganismo, studi in vivo ed in vitro e studi di prevenzione secondaria.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare, la presenza della *C. pneumoniae* nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), nelle placche aterosclerotiche carotidee e nei linfonodi, ottenuti da pazienti sottoposti ad endoarterectomia carotidea.

Sono stati esaminati 51 pazienti, 37 uomini e 14 donne (età media 69±9 anni), con stenosi carotidea 370%, afferenti al Dipartimento di Chirurgia Vascolare dell'Università di Roma "La Sapienza".

Da ogni soggetto è stato prelevato un campione di sangue, un campione di placca carotidea ed il linfonodo sito in prossimità della biforcazione carotidea.

La ricerca della *C. pneumoniae* è stata effettuata in 153 campioni, mediante PCR, utilizzando i primers specie-specifici HL-1/HR-1 e HM-1/HR-1.

Inoltre per ciascun paziente è stata effettuata la ricerca degli anticorpi anti-*C. pneumoniae* mediante microimmunofluorescenza (Labsystem-Dasit).

La *C. pneumoniae* è stata riscontrata nei PBMC, nelle placche carotidee e nei linfonodi rispettivamente nelle percentuali del 52.9, del 39.2 e del 23.5. In particolare, in 12 pazienti, la *C. pneumoniae* è stata riscontrata nei PBMC, nella placca carotidea e nel linfonodo; in 8 pazienti sia nei PBMC e sia nella placca carotidea e in 7 pazienti esclusivamente nei PBMC.

E' stata riscontrata una positività per le IgG e/o IgA anti-*C. pneumoniae* nel 74.5% dei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico. I nostri risultati dimostrano una maggiore prevalenza della *C. pneumoniae* nei PBMC rispetto alle placche carotidee e ai linfonodi, per cui tale ricerca, oltre a confermare, da una parte, la crescente evidenza di una correlazione della *C. pneumoniae* con le malattie cardiovascolari, dall'altra, può costituire una importante e valida procedura diagnostica delle infezioni vascolari.

DIAGNOSI DI INFEZIONE DA PARVOVIRUS B19 MEDIANTE REAL-TIME PCR

Elisabetta Manaresi, Elisa Zuffi, Giorgio Gallinella, Monica Musiani, Marialuisa Zerbini

Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale. Sezione di Microbiologia. Università di Bologna

Parvovirus B19 è un virus per il quale non esistono sistemi in grado di consentirne la replicazione in vitro in maniera efficiente, pertanto la diagnosi virologica d'infezione si basa essenzialmente sulla ricerca del DNA virale direttamente nel campione clinico in esame.

Scopo del nostro lavoro è stato allestire un saggio di real-time PCR per poter rivelare e quantificare in maniera rapida ed accurata la presenza del genoma di parvovirus B19 in campioni di siero.

Il saggio è stato messo a punto utilizzando uno strumento, il LightCycler, che combina i processi di amplificazione del DNA e di rivelazione dell'amplificato in un unico sistema chiuso rappresentato da un capillare di vetro con la formazione degli amplificati monitorata in continuo mediante il colorante fluorescente SybrGreen I.

Inizialmente sono state ottimizzate le condizioni di reazione, quindi il saggio è stato impiegato per testare 108 campioni di siero provenienti al nostro laboratorio con un sospetto clinico di infezione da B19. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in parallelo mediante un saggio standardizzato di PCR-ELISA e dal confronto è emerso che il sistema real-time messo a punto ha una sensibilità pari a 92.7% e una specificità pari a 100%. Successivamente il livello di DNA riscontrato nei campioni positivi a parvovirus B19 è stato messo in correlazione con le diverse fasi di infezione da B19: il valore medio di B19 DNA è risultato pari a 1.1×10^9 copie/ml nei campioni in fase precoce (DNA+, IgM+, IgG-), si è ridotto in maniera statisticamente significativa a 4.3×10^6 copie/ml nei campioni in fase acuta (DNA+, IgM+, IgG+) ed è risultato pari a 3.7×10^5 copie/ml nei campioni in fase tardiva (DNA+, IgM-, IgG+).

In conclusione, il saggio di real-time PCR per la rivelazione quantitativa di parvovirus B19 ha dimostrato buone caratteristiche di sensibilità, specificità e rapidità e come tale, rappresenta un utile strumento nella diagnosi di infezione da B19.

VALUTAZIONE DELL'INFETTIVITÀ IN VITRO DI POOL DI PLASMA CONTAMINATI DA PARVOVIRUS B19

Francesca Bonvicini, Giorgio Gallinella, Monica Cricca, Elisa Zuffi, Monica Musiani, Marialuisa Zerbini

Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Sezione di Microbiologia, Università di Bologna

Parvovirus B19 può essere presente nel sangue ad elevate concentrazioni e perciò può comunemente contaminare pool di plasma ed emoderivati: la trasmissione del parvovirus B19 attraverso singole donazioni di sangue o plasma, pool di plasma ed emoderivati è un evento ripetutamente osservato. E' quindi di rilevante importanza lo screening dei pool di plasma per evitare che pool contaminati da parvovirus B19 ad un titolo superiore a 10^4 geq/ml possano rientrare nella produzione di emoderivati e quindi contribuire alla trasmissione dell'infezione.

Scopo del nostro lavoro è stato verificare l'infettività in vitro di pool di plasma contaminati da parvovirus B19. Cellule sensibili e permissive all'infezione virale (KU812Ep6, linea cellulare di derivazione mieloide) sono state infettate con diversi pool di plasma, raccolte alle 24 ore ed esaminate per la presenza degli acidi nucleici mediante un saggio di ibridazione in situ e degli antigeni virali tramite un saggio di immunofluorescenza.

Gli acidi nucleici virali sono stati ricercati mediante ibridazione in situ utilizzando una sonda prodotta e marcata in PCR: l'ibrido è stato evidenziato mediante rivelazione immunocitochimica del marcante digossigenina. Gli antigeni virus-specifici, sono stati ricercati mediante saggio di immunofluorescenza indiretta utilizzando un siero umano di riferimento contenente anticorpi specifici per le proteine capsidiche virali.

I risultati ottenuti dall'infezione della linea cellulare KU812Ep6 con diversi pool di plasma contaminati dal parvovirus B19 dimostrano che pool ad alto titolo virale sono infettanti: dopo 24 ore dall'infezione il virus replica e produce le proteine virali in un'elevata percentuale di cellule. A titoli più bassi, il numero di cellule infettate diminuisce e l'infettività è dimostrabile solo mediante ricerca degli acidi nucleici.

In conclusione, la dimostrazione dell'infettività in vitro di pool ad alto titolo virale conferma l'utilità dello screening per la ricerca di contaminazioni da parvovirus B19. Inoltre, il saggio di infettività in vitro mediante ibridazione in situ può essere utile per la valutazione dell'efficacia dei processi di rimozione ed inattivazione virale nella produzione di emoderivati.

LE POSSIBILI APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE DI PSEUDOMONAS IN CAMPO AMBIENTALE

F. Baldi e G. Ravagnan

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università Cà Foscari, Calle S. Marta Dorsoduro, Venezia

Le *Pseudomonas* sono batteri che si adattano facilmente in ambienti inquinati e spesso hanno un ruolo importante nella degradazione di composti organici tossici e nella trasformazione dei metalli pesanti. Diversi anni fa è stato isolato dalle miniere di cinabro (HgS) del Monte Amiata, nella Toscana meridionale, un ceppo di *Pseudomonas putida*, che porta una resistenza ad ampio spettro verso i composti del mercurio sia inorganici che organici. Questa resistenza è conferita al ceppo da un operone *mer* che sintetizza una liasi organomercuriale che trasforma gli organomercuriali producendo l'idrocarburo corrispondente. Per esempio, il metilmercurio viene degradato a metano e Hg^{2+} che a sua volta viene trasformato a $Hg(0)$ da una mercurio riduttasi. Quest'ultimo enzima è molto diffuso tra i batteri che colonizzano ambienti inquinati da mercurio. Il ceppo FB1 di *P.putida* è stato utilizzato in un bioreattore per rimuovere Hg da acque inquinate sotto forma gassosa. Recentemente i ricercatori dei laboratori GBF di Braunschweig (D) in collaborazione con una ditta per il trattamento di acque (Preussag Wassertechnik) hanno sviluppato un processo che utilizza un altro ceppo di *P.putida* che viene sfruttato per la capacità di riduzione del mercurio ionico, ma invece di volatilizzarlo, viene accumulato come $Hg(0)$ e condensarlo in un biofilm prodotto dal microrganismo che si sviluppa su pietre porose. L'impianto riesce a rimuovere il 99% di mercurio.

Recentemente è stata isolata una comunità microbica dalla laguna veneta in grado di degradare idrocarburi alifatici. In particolare tre specie di *Acinetobacter venetianus*, *P. putida* e *Alcaligenes eutrophus* con capacità degradative diverse. Il primo ossida gli alcani con una mono-ossigenasi, il secondo e terzo hanno delle deidrogenasi che funzionano su alcoli, aldeidi ed acidi grassi ad alto numero di atomi di carbonio. E' stato rilevato che la degradazione di gasolio in comunità è stimolata.

Recentemente sono stati isolati dei microrganismi dei quali alcuni appartengono alla specie *Pseudomonas* che sono in grado di degradare idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in condizioni di laboratorio. Un progetto di decontaminazione in situ di idrocarburi nei sedimenti della laguna in zona Malcontenta è in corso

QUALITÀ IN MICROBIOLOGIA: STUDIO DELLE MODALITÀ DI ESECUZIONE DELLE EMOCOLTURE E LORO EPIDEMIOLOGIA

M. Bernardi¹, C. Paladini¹, M. Calvitto¹, L. Morbidoni², E. Manso¹

¹Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera Umberto I^o, Ospedale di Torrette, Ancona; ²Istituto di Clinica Medica Università degli Studi di Ancona

Attualmente la qualità è l'obiettivo principale nell'attività di laboratorio al fine di garantire risultati affidabili e clinicamente utili per il management della cura del paziente. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare la qualità di esecuzione delle emocolture, esame gold standard per la diagnosi di setticemia, nei diversi reparti del nostro Ospedale e di determinare l'epidemiologia delle batteriemie. I parametri che abbiamo valutato per raggiungere questo obiettivo sono stati la verifica del numero di set di emocolture effettuate per episodio infettivo (prelevate nell'arco di 24 ore) e la determinazione del tasso di contaminazione delle emocolture negli anni 1998 – 1999. I risultati dell'indagine sono stati inviati ai primari dei vari servizi, comunicando i dati in nostro possesso e esprimendo le necessarie raccomandazioni per migliorare la qualità. Successivamente negli anni 2000 e 2001 abbiamo ripetuto lo studio per valutare se potevamo constatare miglioramenti significativi. Inoltre ci siamo proposti di cercare l'esistenza di linee guida basandoci su quanto recepito dalla Medicina Basata sull'Evidenza (EBM). Abbiamo completato lo studio mediante un questionario compilato da tutto il personale medico e infermieristico del Dipartimento di Medicina Interna con l'obiettivo di verificare le conoscenze da parte del personale ospedaliero relativamente alle corrette modalità da adottare. Dai risultati ottenuti è ancora risultata evidente la disomogeneità delle risposte, la mancanza di una metodologia unica, corretta cui fare riferimento, con conseguente tasso elevato di emocolture contaminate; vi è la necessità quindi di improntare un protocollo operativo e di predisporre materiale informativo sui punti cardine (disinfezione, modalità del prelievo, tempi e numero di prelievi), elaborato in maniera sintetica e incisiva, da distribuire al personale infermieristico, monitorando poi nel tempo l'aderenza del personale alle istruzioni impartite. Per quanto riguarda l'analisi epidemiologica, su 302 episodi infettivi considerati abbiamo ottenuto una prevalenza dei batteri Gram positivi (48%) nei reparti di Medicina, mentre nei reparti di Chirurgia e Rianimazione si verifica la tendenza opposta, con una prevalenza dei Gram negativi rispettivamente del 53% e del 50%; tra questi i microrganismi più frequentemente isolati sono stati *E. coli* e KES nelle Chirurgie, KES e *P. aeruginosa* nelle Rianimazioni.

IDENTIFICAZIONE DI FATTORI DI VIRULENZA DI *HELICOBACTER PYLORI* RESPONSABILI DELL'INDUZIONE DELLA CICLOOSSIGENASI DI TIPO 2 E DEI FATTORI DI CRESCITA APPARTENENTI ALLA FAMIGLIA DELL'EGF IN CELLULE DI MUCOSA GASTRICA IN CULTURA.

Anna Di Popolo, Renato Acquaviva, Ferdinando Giacco, and Raffaele Zarrilli.

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Centro di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale "G. Salvatore" del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Università "Federico II", Napoli.

Helicobacter pylori (*Hp*) è un batterio Gram-negativo che colonizza la mucosa gastrica ed è responsabile di differenti patologie nell'uomo, quali la gastrite cronica, l'ulcera peptica ed il carcinoma gastrico. Abbiamo studiato la risposta della cellula epiteliale gastrica al danno indotto dal batterio in un sistema *in vitro* e dimostrato che *Hp* induce l'espressione di fattori di crescita appartenenti alla famiglia dell'EGF e l'aumentata espressione di cicloossigenasi di tipo 2 (COX-2) e la sintesi di prostaglandine, ma inibisce la proliferazione indotta da tali fattori di crescita ed induce apoptosi.

I nostri dati precedenti suggeriscono che i fattori di virulenza presenti nei filtrati di coltura batterici responsabili dell'induzione dei fattori di crescita appartenenti alla famiglia dell'EGF e della COX-2 sono indipendenti e diversi da quelli già identificati (quali VacA, CagA ed Ureasi). Il presente progetto di ricerca si propone pertanto di identificare biochimicamente le molecole rilasciate dal batterio in filtrati di brodocoltura allestiti con terreni di crescita chimicamente definiti. I dati finora ottenuti mostrano che il/i fattori di virulenza responsabili dell'aumentata espressione dei fattori di crescita appartenenti alla famiglia dell'EGF e della COX-2 hanno un peso molecolare compreso tra 50 e 60 kD e sono termolabili. L'analisi mediante SDS PAGE del picco di attività mostra un pattern di tre distinte proteine con peso molecolare apparente di 39, 28 and 22 kDs. Esperimenti sono in corso per ottenere brevi sequenze amminoacidiche di tali proteine batteriche per clonare ed ulteriormente caratterizzare tali fattori di virulenza.

RUOLO DI ALCUNE MOLECOLE ANTIMICROBICHE SUL RILASCIO *IN VITRO* DI CITOCHINE DA PARTE DEI GRANULOCITI UMANI.

Cuffini A.M., Tullio V., Reato G., Mandras N., Scalas D., Banche G. e Carlone N.A.

Dipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia dell'Università degli Studi di Torino.

Studi da noi precedentemente effettuati hanno evidenziato che alcune molecole antimicrobiche, appartenenti a classi differenti, sono in grado di incrementare notevolmente, seppur con meccanismi differenti, le funzioni primarie dei fagociti umani nei confronti di batteri e di miceti nel soggetto sano. A completamento dello studio, si è voluto pertanto valutare l'eventuale ruolo esercitato da questi farmaci sul rilascio di alcune fra le più importanti citochine quali mediatori biologici, attivatori e inibitori delle funzioni di fagocitosi e di killing dei fagociti.

La sperimentazione è stata condotta utilizzando, come fagociti, granulociti polimorfonucleati (PMN) ottenuti da donatori sani, come batterio, un ceppo di *Klebsiella pneumoniae* di recente isolamento clinico e, come farmaci, il co-amoxiclav, il sanfetrinem, la claritromicina, la prulifloxacin e la tobramicina. L'espressione dei messaggeri per le citochine in esame (IL-8, IL-10, IL-6, IL-1 β , TNF- α) è stata determinata mediante PCR del DNA complementare all'RNA estratto dai PMN, in differenti condizioni sperimentali.

I risultati ottenuti evidenziano che il sanfetrinem, la claritromicina, la prulifloxacin e la tobramicina sono in grado di modulare significativamente l'espressione dell' IL-6, quale importante citochina proinfiammatoria implicata nel potenziamento delle attività primarie dei PMN. Differente il quadro ottenuto in presenza di co-amoxiclav: l'espressione del messaggero risulta amplificata non solo per IL-6, ma anche per il TNF- α , IL-1 β e soprattutto IL-8. Nessun farmaco è risultato invece in grado di modulare l'espressione per la citochina antinfiammatoria IL-10. Poiché nei soggetti immunocompromessi la frequente incidenza di processi patologici su base infettiva determina spesso la necessità di una prolungata antibiotico-terapia, il rilascio di citochine indotto da questi farmaci, acquista un particolare e notevole significato clinico.

INFLUENZA DEL TIAMFENICOLO GLICINATO ACETILCISTEINATO SULLE FUNZIONI PRIMARIE DEI PMN UMANI NEI CONFRONTI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

N.A. Carlone, V. Tullio, A.M., Cuffini, D. Scalas, Banche G., Barreca M.

Dipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia-Università di Torino

Il successo terapeutico nel trattamento di un'infezione microbica è il risultato di un approccio multidisciplinare che deve tener conto delle caratteristiche cinetiche e microbiologiche dei farmaci, dei fattori inerenti i microrganismi e del sistema immunitario dell'ospite. L'azione diversificata delle varie famiglie di antibiotici sui fattori di virulenza batterica, sull'adesività, su alcuni processi fisiologici dei fagociti (fagocitosi, attività microbica, rilascio di citochine, apoptosi,...) dovrebbe costituire sempre di più un parametro di valutazione e di scelta nell'approccio della cosiddetta terapia empirica ragionata.

In questo lavoro abbiamo valutato l'interazione *in vitro* del tiamfenicolo, principio microbiologicamente attivo del tiamfenicolo glicinato acetilcisteinato (TGA), a dosi subinibenti ($1/2$ MIC), sulle funzioni primarie dei PMN umani nei confronti di un ceppo ospedaliero di *Streptococcus pyogenes*, uno dei principali patogeni respiratori. I risultati indicano che il tiamfenicolo, pur non incrementando significativamente la capacità fagocitaria dei PMN, determina uno spiccato aumento dell'attività microbica intracellulare rispetto a quella riscontrata nei sistemi di controllo.

Per valutare se questo incremento fosse imputabile ad un'azione diretta del tiamfenicolo sul batterio o sul fagocita, sono stati condotti ulteriori esperimenti esponendo i batteri e/o i PMN a $1/2$ MIC di farmaco. Il pretrattamento con l'antibiotico di entrambi i sistemi, non influenza la capacità fagocitaria dei PMN che internalizzano i batteri con percentuali sovrapponibili ai sistemi di controllo non trattati. Al contrario, i batteri pretrattati vengono uccisi in percentuale superiore a quelli non trattati, indicando un'azione diretta del farmaco sugli streptococchi che risultano quindi meno virulenti e più vulnerabili a seguito di un'alterata sintesi proteica. Anche il pretrattamento dei fagociti con il tiamfenicolo stimola in modo significativo l'attività microbica intracellulare, in quanto in grado di penetrare nelle cellule, di rimanervi attivo e di agire sui batteri intraPMN.

L'insieme dei dati ottenuti indica che il tiamfenicolo è in grado di agire positivamente sul binomio fagocita-batterio, confermando la validità di questo antibiotico nel trattamento delle infezioni respiratorie sostenute da patogeni difficili.

TINEA CORPORIS DA TRICOPHYTON MENTAGROPHYTES IN SEGUITO A CONTATTO CON CONIGLI DOMESTICI D'AFFEZIONE E D'ALLEVAMENTO

V. Tullio, O. Cervetti*, M. Panzone*, A.M. Cuffini, J. Roana e N.A. Carlone

Dipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia - Università di Torino

*Clinica Dermatologica II – Dipartimento di Malattie Cliniche e Chirurgiche - Università di Torino

I dermatofiti zoofili, come *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes*, rappresentano un gruppo ecologico che, nel processo di adattamento alle condizioni ambientali, ha raggiunto un alto grado di sviluppo. La capacità che queste specie hanno di sopravvivere a lungo nel suolo, sulla pelliccia di animali sani, oppure di produrre lesioni inapparenti, costituisce un problema epidemiologico di grande importanza economica e sociale perché favorisce sia la diffusione di questi agenti eziologici sia la trasmissione all'uomo provocando infezioni cutanee. E' fenomeno noto ed ampiamente discusso in letteratura che gli animali domestici e selvatici costituiscono il serbatoio di molti dermatofiti; per contribuire a prevenire i rischi di infezione, è importante effettuare indagini di laboratorio e ricerche microbiologiche finalizzate alla conoscenza delle principali fonti di diffusione delle dermatofizie.

In questo lavoro sono descritti 4 casi di *tinea corporis* dovuta a contatto con conigli domestici d'affezione e d'allevamento. I soggetti colpiti, un bambino di 11 anni e 3 adulti, di cui 2 di sesso maschile e uno di sesso femminile, di razza caucasica, presentavano lesioni eritemato-squamose figurate, ad estensione periferica, localizzate al volto, arti superiori ed, in un caso, all'addome. L'esame obiettivo delle lesioni e l'osservazione microscopica dei campioni cutanei, trattati con KOH al 10%, indicavano eziologia fungina, confermata dall'esame colturale. L'aspetto macroscopico delle 4 colonie isolate su Mycosel agar (micelio bianco-crema, cotonoso, con zone ad aspetto granuloso per la elevata presenza di microconidi, rovescio marrone-giallastro) e quello microscopico (numerossimi microconidi globosi disposti a "grappolo d'uva", presenza di ife a spirale, rari macroconidi lisci, a parete sottile) ha permesso di identificare i ceppi come *T.mentagrophytes var.mentagrophytes*.

I pazienti sono stati trattati con farmaci antimicotici per via generale (itraconazolo o terbinafina) e locale (alcol iodato e ciclopiroxolamina), con negativizzazione dei parametri clinici e laboratoristici.

L'INTERAZIONE DI CELLULE DENDRITICHE (DC) CON ASPERGILLUS FUMIGATUS: STUDI IN VIVO.

Roberta Gaziano§, Silvia Bozza*, Antonio Spreca°, Angela Bacci*, Claudia Montagnoli*, Paolo Di Francesco§, Francesco Bistoni*, Luigina Romani*

Sezioni di *Microbiologia e °Anatomia, Dip. Med Sper e Sc Bioch, Univ Perugia, §Sezione di Microbiologia, Dip. Med Sper, Univ Tor Vergata, Roma.

E' noto che i linfociti T CD4+ giocano un ruolo chiave nella risposta immunitaria antifungina. L'attivazione di subsets Th1, attraverso la produzione di IFN- γ è associata a risposte protettive per l'ospite. Al contrario, la produzione di IL-4 e IL-10 da parte di Th2 è correlata con la progressione dell'infezione. E' noto che le cellule dendritiche (DCs), specializzate nella presentazione dell'antigene, sono le uniche cellule dell'immunità innata implicate nell'induzione di risposte T helper in senso Th1 o Th2. Abbiamo studiato in un modello sperimentale di aspergillosi polmonare il ruolo svolto dalle DC nella risposta verso *A. fumigatus*. Studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che le DCs fagocitano sia i conidi, con un avvolgimento a spirale "coiling" che le ife con un tipo di fagocitosi "zypper type", nei primi 60 min. di esposizione al fungo. L'uptake aumenta in funzione del tempo di esposizione e della carica fungina e coinvolge recettori diversi per le due forme. Inoltre, infettando i topi per via intratracheale con conidi e ife marcati con FITC, le DCs migrano nelle prime 3h dal polmone ai linfonodi mediastinici. Mediante analisi citofluorimetrica le DC isolate dai linfonodi 3h dopo l'infezione sono morfologicamente mature, come suggerisce l'aumentata espressione di molecole MHC di classe II e di molecole di costimolazione CD80 e CD86. Nei topi infettati con conidi aumenta, sia nei linfonodi che a livello splenico, il numero dei T CD4 positivi per IFN- γ . Al contrario, un aumento di T CD4 positivi per IL-4 e IL-10 è stato osservato negli animali infettati con ife. Questi risultati sono supportati dall'evidenza che DC del polmone incubate *in vitro* con conidi producono elevati livelli di IL-12, citochina chiave nell'induzione di risposte Th1, mentre elevati livelli di IL-4 e IL-10, implicate nell'induzione di risposte Th2, sono stati rilevati nelle colture di DC incubate con ife. Nel nostro modello sperimentale quindi le DC del polmone discriminano le due forme del fungo in termini di produzione di citochine e istruiscono i linfociti T helper verso una risposta Th1 o Th2 in relazione al tipo di antigene. E' quindi ipotizzabile che le DC costituiscano un valido bersaglio per modulare *in vivo* risposte T helper, aprendo la possibilità di nuovi approcci terapeutici nel campo dell'immunoterapia antimicrobica.

TIPIZZAZIONE SIEROLOGICA E TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Stefania Stefani e Maria Santagati

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche – Università degli Studi di Catania - Italia

E mail stefanis@mbox.unict.it

L'abilità di discriminare tra microrganismi è un processo essenziale in molti settori di ricerca della microbiologia, includendo la tassonomia, gli studi sui meccanismi evolutivi e le correlazioni filogenetiche, gli studi di genetica di popolazione e di epidemiologia dei microrganismi. Lo sviluppo di un sistema di tipizzazione si basa sull'osservazione che, benché microrganismi diversi appartenenti alla stessa specie condividano caratteri comuni, essi mostrano contemporaneamente delle differenze. Identificazione e tipizzazione possono essere ottenute con metodi fenotipici (basati quindi su caratteri biochimici, sierologici, fisiologici) oppure mediante quei metodi genotipici, definiti ad alta risoluzione, che variano dal profilo plasmidico, alla PCR-typing, PFGE, ribotipo, fino al sequenziamento di geni housekeeping. Il metodo scelto per tipizzare, oltre che determinato dalla natura del problema microbiologico da risolvere, deve possedere capacità discriminatorie, un alto grado di riproducibilità, una adeguata stabilità, una facilità di interpretazione e un forte potere di risoluzione. Ma i metodi genotipici di tipizzazione con diversi livelli di risoluzione, se applicati a diversi microrganismi, possono rivelare differenti livelli di variabilità genetica, e quest'ultimo aspetto è strettamente collegato alla struttura della popolazione microbica e alle modalità del processo evolutivo di variabilità all'interno di una determinata specie. *Streptococcus pneumoniae*, dal punto di vista della struttura di popolazione a livello molecolare, è un microrganismo caratterizzato da una frequenza elevata di trasferimenti genetici e da una plasticità genomica mediata dalla trasformazione naturale. Ma *S. pneumoniae* è anche un patogeno importante dell'uomo, sia in età adulta che pediatrica, e le infezioni da esso sostenute sono associate con alta mortalità e morbilità. Inoltre, l'acquisizione e la diffusione di numerosi determinanti di resistenza (penicillina, macrolidi, tetracicline etc) ha reso ancora più difficile il trattamento delle infezioni da esso sostenute. La distinzione in sierotipi (più di 90) basata sui polisaccaridi capsulari, che sono un'importante componente della patogenicità di questo microrganismo, comincia a mostrare correlazioni insufficienti con la diffusione epidemiologica di questa specie. Al momento, noi non conosciamo abbastanza circa il contributo di geni capsulari rispetto a quelli non-capsulari ai fini della virulenza, inoltre un carattere selezionabile come quello dell'antibiotico-resistenza in questo microrganismo, pur essendo relativamente recente (solo 20 anni), è stato in grado di cambiare il suo scenario epidemiologico.

NUOVI FARMACI CONTRO I PATOGENI GRAM-POSITIVI

Stefania Stefani

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche – Università degli Studi di Catania - Italia

E mail stefanis@mbox.unict.it

L'elevato numero di specie microbiche resistenti agli antibiotici e la loro prevalenze in numerose infezioni, ha posto l'attenzione sulla inadeguatezza dell'attuale "arsenale antibiotico" attivo nei loro confronti. I batteri Gram-positivi, principali patogeni in numerose infezioni nosocomiali e comunitarie dell'ultimo ventennio, hanno sviluppato numerosi meccanismi di resistenza verso gli antibiotici in uso, ponendo l'accento, da una parte, sulla necessità di sviluppare nuove molecole eventualmente disegnate su nuovi bersagli molecolari, dall'altra, sulla necessità di usare con prudenza gli antibiotici efficaci.

Lo sviluppo di nuove molecole fino al loro arrivo al paziente è un processo molto lungo, dispendioso e spesso, rispetto ad un gran numero di molecole portate in sviluppo dall'industria farmaceutica, solo poche raggiungono le fasi più avanzate della sperimentazione e il loro utilizzo nella pratica clinica. Tra queste ricordiamo i nuovi fluorchinoloni, chetolidi, oxazolidinoni, lipopetidi, streptogramine e glicilcicline.

TEMPI DI ACCUMULO E DEPURAZIONE DI *E. COLI*, *E. DURANS* E *V. CHOLERA*E NON-O1 IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

MARINO A., LOMBARDO L., FIORENTINO K., MONTICELLI L.², ORLANDELLA B. M.¹, NOSTRO A., CRISALFI G., ALONZO V.

DIPARTIMENTO FARMACO-BIOLOGICO E ¹DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA INFETTIVA E PARASSITARIA, ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI O.A. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA.

²ISTITUTO TALASSOGRAFICO SPERIMENTALE (CNR). MESSINA

I controlli microbiologici per la certificazione della salubrità e dell'igienicità dei molluschi bivalve richiedono la ricerca di *E. coli*, come indice di contaminazione fecale, e di *S. typhi*, mentre non viene richiesta, di norma, quella di *V. cholerae* non-O1. Tale patogeno invece è tra quelli che oggi bisognerebbe tenere sotto controllo, vista la frequenza e la velocità dei viaggi intercontinentali anche in e da paesi in via di sviluppo. È stato recentemente dimostrato che rispetto a *Vibrio cholerae* O1, i ceppi appartenenti al sierogruppo non-O1, oltre a permanere a lungo in ambiente acquatico, sono maggiormente capaci di sopravvivere e moltiplicarsi in un ampio range di alimenti. Gli esperimenti condotti hanno tenuto in considerazione i tempi di accumulo e depurazione di *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 ed *Enterococcus durans* nel liquido intervalvare e nei tessuti di *Mytilus Galloprovincialis*. I mitili sono stati mantenuti in acqua di mare contaminata con una carica di circa 10⁶ cellule/ml e successivamente, sottoposti ad un flusso continuo di acqua di mare con caratteristiche microbiologiche controllate. Ogni ceppo in esame è stato testato sia in coltura singola che in coltura mista alle temperature stagionali di 14 e 21°C. I risultati ottenuti dimostrano che, sia in caso di contaminazione dell'acqua con coltura singola che con coltura mista, i ceppi in esame si accumulano rapidamente nei mitili, raggiungendo concentrazioni elevate già dopo 1 ora dalla contaminazione; in particolare, rispetto a *V. cholerae* non-O1, *E. coli* raggiunge una concentrazione inferiore mentre *E. durans* una concentrazione superiore, indipendentemente dalle temperature saggiate. Per quanto riguarda la depurazione, *E. coli* viene rilasciato dai mitili più rapidamente di *E. durans* e *V. cholerae* non-O1 ad entrambe le temperature stagionali, mentre *E. durans* permane più a lungo anche di *V. cholerae* nelle vasche di depurazione, soprattutto alla temperatura di 14°C. Non vi sono differenze fra i dati delle colture singole e quelli delle colture miste.

L'osservazione dei risultati consente di potere suggerire che l'enterococco potrebbe essere ritenuto, per questo tipo di alimenti, un indice di contaminazione fecale migliore di *E. coli* in quanto attendibile anche per il controllo di un patogeno importante quale il vibrione del colera.

LE MUTAZIONI OSSERVATE NEI MACROFAGI PRIMARI UMANI DOPO TRATTAMENTO CON FARMACI INIBITORI DELLA TRASCRIPTASI INVERSA NON CONFERISCONO RESISTENZA

A. Cenci¹, F. Ceccherini-Silberstein², S. Menzo³, M. Clementi⁴, L. Marcon⁵, F. Marcuccilli², S. Giannella², P. Bonini², R. Calio², CF. Perno^{1,2}, S. Aquaro². ¹IRCCS L. Spallanzani, Rome, ²Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Roma Tor Vergata, ³Istituto di Microbiologia, Università di Ancona, ⁴Dip. di Scienze Biomediche, Università di Trieste, ⁵Dip. di Microbiologia, Università di Padova.

I macrofagi rappresentano un importante serbatoio di HIV durante l'infezione. Poiché la cinetica di replicazione virale è più lenta nei macrofagi che nei linfociti CD4+, ci si è chiesti se lo sviluppo di resistenza nei macrofagi potesse differenziarsi dai linfociti.

Obiettivi: Osservare lo sviluppo di resistenza ai farmaci antivirali inibitori della trascrittasi inversa nei macrofagi infettati da HIV.

Materiali e Metodi: Macrofagi primari umani (M/M) sono stati infettati con HIV-1 BaL in presenza o assenza di inibitori della trascrittasi inversa (AZT, 3TC, PMEA, TSAO). Ogni due settimane sono stati effettuati passaggi cellulari trasferendo supernatanti di M/M infettati ad una coltura di M/M freschi proveniente da un altro donatore. Il DNA provirale è stato estratto, e sequenziato. Sono stati eseguiti test di fitness utilizzando sia il virus wildtype che il virus 3TC-resistente (che porta la mutazione M184V) sia in PBMC che in macrofagi. La produzione virale è stata monitorata tramite sia il dosaggio del rilascio di p24 Ag nel sovrantante, sia la quantificazione dell'attività retrotrascrittasi. **Risultati:** I dati di p24 e nested PCR erano sempre in accordo. Non è stato osservato alcun sviluppo fenotipico e genotipico di resistenza neanche dopo 7 passaggi in vitro (105 giorni). Le poche mutazioni osservate, soprattutto silenziose e conservative, avvenivano in modo casuale in presenza e assenza di farmaci. Il mutante M184V replicava meno bene rispetto al wildtype sia nei PBMC che nei macrofagi. Il virus mutante M184V era stato confermato per la resistenza nei macrofagi infettati e trattati con 3TC. Il virus M184V aveva una produzione di p24 ridotta del 30% ed una attività della RT ridotta del 60% rispetto al wt nei macrofagi infettati.

Conclusioni: Nelle nostre condizioni sperimentali, non si è osservato lo sviluppo di resistenza. Ciò si spiega in parte perché i macrofagi sono cellule "resting", da cui ne consegue una più lenta cinetica della trascrittasi inversa virale, che può ridurre il tasso di mutazioni, rispetto ai linfociti. I macrofagi in vivo quindi, potrebbero presentare un quadro di resistenza diverso a quello presente nei linfociti CD4+.

PREVALENZA DI PROTEINE DI INTERNALIZZAZIONE IN CEPPI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ISOLATI DA PORTATORI SANI E DA FARINGOTONSILLITI

R. Musumeci, G. Blandino, C. Lo Bue, I. Milazzo, A. Speciale, G. Nicoletti

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche - Università di Catania - Italia.

Un recente lavoro ha associato la presenza del gene *prtF1* che codifica per la proteina F1 correlata alla capacità di internalizzazione da parte di streptococchi di gruppo A all'interno di epiteliumi umani e la resistenza all'eritromicina di questi batteri. Abbiamo studiato l'associazione esistente tra presenza di *prtF1*, regione RD2 e fenotipi di resistenza in 36 campioni di recente isolamento di *Streptococcus pyogenes* provenienti da 18 portatori sani (gruppo I) e 18 bambini con faringotonsillite (gruppo II). La presenza del gene *prtF1* è stata determinata mediante PCR utilizzando primer complementari alla regione RD2, mentre i fenotipi di resistenza (cMLS, iMLS-A, iMLS-B e M) sono stati determinati con la tecnica del triplo-dischetto.

Il 72% dei ceppi di *S. pyogenes* saggiati, indifferentemente dai due gruppi, presentava il gene *prtF1*.

I risultati hanno evidenziato, inoltre, una differenza significativa per la presenza del gene *prtF1* tra i due gruppi saggiati: il 61% nel gruppo I e l'83% nel gruppo II. Un interessante risultato è che i ceppi isolati da portatore mostrano una notevole diversità di espressione nella regione RD2. Il gene *prtF1* era presente con una percentuale più alta nei ceppi eritromicina-resistenti rispetto ai ceppi eritromicina-sensibili (92% versus 20%).

Questi risultati potrebbero contribuire a spiegare i meccanismi di internalizzazione e persistenza di *S. pyogenes* all'interno delle cellule epiteliali e il ruolo di ceppi esprimenti la proteina F1 nella circolazione epidemiologica di streptococchi di gruppo A resistenti all'eritromicina.

RILEVAMENTO E QUANTIFICAZIONE DI *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* IN CAMPIONI DI PLACCA SOTTOGENGIVALE

I. Milazzo,¹ A. M. LoBue,¹ G. Orrù,² E. Corvino², C. Gaeta,² G. Pozzi,² G. Blandino¹

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche. Università degli Studi di Catania¹, Dipartimento di Biologia Molecolare, Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Università di Siena².

Le parodontiti sono patologie che provocano flogosi e riassorbimento dei tessuti di sostegno dentali. *Porphyromonas gingivalis* è un batterio Gram-negativo anaerobio obbligato implicato nell'etiologia delle parodontiti; il rischio per la progressione della malattia è correlato al titolo batterico presente. Sono stati analizzati 91 campioni clinici di placca sottogengivale e 7 campioni, 7,7%, risultavano positivi per *P. gingivalis* con titoli compresi tra 10^3 e 10^6 batteri/campione. Date le peculiari caratteristiche metaboliche, la quantificazione di questo batterio mediante la coltura è influenzata da numerose variabili non sempre controllabili, (condizioni di prelievo e trasporto, atmosfera e terreno di crescita, tempo intercorso tra prelievo e fasi di laboratorio). Per queste ragioni abbiamo confrontato la metodica colturale con una metodica molecolare basata sulla Real time PCR per il rilevamento e la quantificazione di *Porphyromonas gingivalis* in campioni di placca sottogengivale. Questa metodica è basata sull'utilizzo durante la reazione di PCR di una sonda fluorescente circolare "Molecular Beacon", che emette fluorescenza interagendo in modo altamente specifico con la sequenza target. Per l'effettuazione dei cicli termici e la lettura della fluorescenza è stato utilizzato il "LightCycler System" (Roche Molecular Biochemicals). Esperimenti di ricostruzione hanno dimostrato che si ottengono risposte lineari per concentrazioni che variano da 5×10^4 a 1×10^5 batteri/ul di campione. La quantificazione dei patogeni parodontali effettuata mediante PCR "Real time" correlava con i dati dell'esame colturale nei campioni di placca sottogengivale esaminati, ma l'esame molecolare risultava più veloce riducendo i tempi di analisi da 1 settimana a 60 minuti.

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DEL FAROPENEM NEI CONFRONTI DI PATOGENI ANAEROBI PARODONTALI RESPONSABILI DI INFEZIONI SISTEMICHE.

I. Milazzo, G. Blandino, R. Musumeci, A. Speciale, G. Nicoletti

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università degli Studi di Catania.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia del faropenem (penemico orale), nei confronti di patogeni anaerobi parodontali frequentemente coinvolti in infezioni sistemiche.

L'attività antibatterica è stata valutata effettuando le MIC del faropenem, e degli altri antibiotici a confronto (penicillina G, amoxicillina/clavulanato, cefoxitin, eritromicina, clindamicina e metronidazolo) con il metodo della microdiluzione in brodo (NCCLS), e le curve di battericidia, su alcuni ceppi significativi, alle concentrazioni 1xMIC, 4xMIC e 10xMIC. Sono stati testati 102 ceppi isolati dal fluido crevicolare di tasche parodontali di pazienti parodontopatici: *Porphyromonas gingivalis* (28), *Prevotella* sp. (20), *Actinomyces* sp. (25), *Fusobacterium nucleatum* (14), *Peptostreptococcus* sp. (11), *Campylobacter rectus* (2) e *Bacteroides forsythus* (2).

Tutti i ceppi saggiati erano inibiti da concentrazioni di faropenem $\leq 0,5$ mg/l. È stata dimostrata la produzione di β -lattamasi in *Prevotella* sp. (20%) e in *F. nucleatum* (7%); questi ceppi erano resistenti alla penicillina (MIC > 0.5mg/l). Tenendo conto dei valori di breakpoint previsti dall'NCCLS (1997) per i batteri anaerobi, il 99% dei ceppi saggiati era sensibile ad amoxicillina/clavulanato e cefoxitin, il 95% alla clindamicina e il 91% alla penicillina e al metronidazolo. Per gli anaerobi non sono al momento disponibili i breakpoint per i macrolidi ma il nostro studio ci permette di confermare la resistenza di *Fusobacterium* sp. e dei peptostreptococchi all'eritromicina (MIC₉₀: 16 mg/l).

Le curve di battericidia di faropenem verso *P. gingivalis*, hanno dimostrato alla 12^o ora una completa attività battericida (-3 log cfu/ml) alla concentrazione 4xMIC e 10x MIC. Nei confronti di *Actinomyces* sp. si ottiene una riduzione di 3 log alla 12^o ora soltanto a 10x MIC. Faropenem mostra nei confronti di *E. corrodens* attività battericida (-3log CFU/ml) a 10xMIC e dopo 24 ore.

I nostri risultati mostrano che il faropenem ha un'ottima attività antibatterica nei confronti dei patogeni anaerobi parodontali paragonabile a quella del cefoxitin e dell'amoxicillina/clavulanato, e migliore di quella di clindamicina, metronidazolo e penicillina, antibiotici comunemente utilizzati nei confronti di questi germi.

ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI BERBERINA POTENZIATA DA 5'-METOSSIIDNOCARPINA-D E FEOFORBIDE A ESTRATTI DA *BERBERIS AETNENSIS* C. PRESL.

R. MUSUMECI¹, A. SPECIALE¹, R. COSTANZO¹, A. RAPISARDA², I. MILAZZO¹, L. IAUK¹.

¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università degli Studi di Catania.

²Dipartimento Farmaco-biologico, Università degli Studi di Messina.

Introduzione-Gli estratti ottenuti dalle radici di varie specie del genere *Berberis* hanno dimostrato possedere una significativa attività antimicrobica, principalmente dovuta agli alcaloidi isochinolinici presenti negli estratti stessi. La presenza di pompe d'efflusso MDR (Multi Drug Resistance) per varie classi di antibiotici in ceppi batterici ad essi resistenti previene l'azione intracellulare degli alcaloidi berberinici che vengono così prontamente espulsi. Studi precedenti hanno dimostrato che piante del genere *Berberis* produttrici di berberina sintetizzano sostanze (5'-metossiindnocarpina-D e feoforbide A) prive di attività antibatterica, in grado però di bloccare le pompe d'efflusso permettendo alla berberina di svolgere la sua attività.

Si è cercato di isolare tali inibitori da *Berberis aetnensis* C. Presl. (*Berberidaceae*), pianta endemica dell'Etna. Essa è un arbusto cespuglioso-spinoso, con rami tortuosi e foglie strettamente ellittiche spinuloso-serrate. I fiori gialli sono riuniti in racemi; il frutto è una bacca rosso scuro.

Metodi-La corteccia polverizzata della radice di *B. aetnensis* è stata estratta mediante macerazione con EtOH e l'estratto secco testato su ceppi ATCC di *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*. Sono stati inoltre presi in considerazione ceppi mutanti con espressione di pompa MDR. L'attività dell'estratto è stata paragonata all'attività di diversi antimicrobici e di berberina cloruro mediante determinazione della sensibilità ad essi (MIC). Per isolare gli inibitori di pompa MDR le foglie polverizzate sono state poste a macerare in esani prima ed in CHCl₃ dopo. L'estratto cloroformico è stato portato a secco *in vacuo* e il residuo sottoposto a flash-cromatografia. Le frazioni ottenute sono state testate sui diversi ceppi batterici.

Risultati-Gli estratti della corteccia della radice di *B. aetnensis* possiedono una chiara attività antimicrobica soprattutto nei confronti dei miceti e di *S. epidermidis*. La flash-cromatografia ha fornito diverse frazioni attive. La mancanza di attività antimicrobica da parte delle frazioni da sole e l'inibizione della crescita quando combinate con dosi subinibitorie di berberina e di altri antibiotici è indicativo della presenza di possibili inibitori di pompe MDR.

Conclusioni-Questo lavoro ipotizza la presenza di inibitori di pompa MDR in *Berberis aetnensis* C. Presl. e ha confermato la loro azione sinergica agli antimicrobici naturali presenti nella pianta.

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI ESTRATTI DI PIANTE OFFICINALI NEI CONFRONTI DI BATTERI ANAEROBI PARODONTALI.

I. MILAZZO¹, G. BLANDINO¹, R. MUSUMECI¹, A. SPECIALE¹, A. RAPISARDA², L. IAUK¹.

¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università degli Studi di Catania.

²Dipartimento di Farmaco-biologico, Università degli Studi di Messina.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'attività delle radici di *Althaea officinalis* L., dei fiori di *Arnica montana* L., dei fiori di *Calendula officinalis* L., delle foglie di *Hamamelis virginiana* L., dei frutti di *Illicium verum* Hook. e delle foglie di *Melissa officinalis* L., nei confronti di batteri parodontali anaerobi e aerobi facoltativi. I ceppi batterici saggiati sono stati: *Porphyromonas gingivalis* (5), *Porphyromonas asaccharolytica* (1), *Prevotella* spp. (3), *Fusobacterium nucleatum* (1), *Capnocytophaga gingivalis* (1), *Veillonella parvula* (1), *Eikenella corrodens* (1), *Peptostreptococcus micros* (2), e *Actinomyces odontolyticus* (3). Gli estratti metanolici di *H. virginiana* e di *A. montana* e in misura minore di *A. officinalis*, hanno mostrato di possedere un'attività inibente ($MIC \leq 2048$ mg/ò) nei confronti della maggior parte delle specie testate. Gli estratti di *M. officinalis* e di *C. officinalis* nei confronti di tutte le specie saggiate, con l'eccezione di *Prevotella* spp., mostrano un'attività inibente meno marcata ($MIC \geq 2048$ mg/l). Infine, l'estratto metanolico di *Illicium verum* mostra una buona attività antibatterica soltanto nei confronti di *E. corrodens*. Nessuno degli estratti ha mostrato attività battericida.

I risultati di questo studio permettono di suggerire l'uso degli estratti alcolici di *H. virginiana*, *A. montana* e *A. officinalis* in medicinali per uso topico nella profilassi di parodontopatie.

EZIOLOGIA BATTERICA ED ANTIBIOTICO-RESISTENZA NELLA ESACERBAZIONE ACUTA DELLA BRONCHITE CRONICA

C. Torrisi, G. Blandino, I. Milazzo, R. Musumeci, G. Di Maria*, G. Nicoletti

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università degli Studi di Catania

* Istituto di Mal. App. Respiratorio Az. Osp. Ascoli Tomaselli

Il presente studio è stato condotto per correlare l'eziologia della esacerbazione acuta della bronchite cronica, con i tre stadi di gravità indicati dall'American Thoracic Society.

L'analisi batteriologica veniva effettuata su campioni di espettorato (idoneo secondo il metodo di Bartlett) di 117 pazienti arruolati in base a criteri ben stabiliti.

La funzionalità polmonare è stata classificata utilizzando tre stadi di gravità: stadio I, VEMS $\geq 50\%$ del valore teorico; stadio II, VEMS da $>35\%$ a $<50\%$; stadio III, VEMS $\leq 35\%$. Sono stati differenziati tre gruppi di batteri: gruppo 1 *S. pneumoniae* e *S. aureus*; gruppo 2 *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* e *M. catarrhalis*; gruppo 3 *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp.

Lo studio della sensibilità agli antibiotici è stato eseguito con la metodica della microdiluzione con strumento SCEPTOR.

I risultati hanno mostrato che allo stadio I il 18,6% delle colture positive è del gruppo 1, il 25,7% del gruppo 2 ed il 55,7% del gruppo 3; allo stadio II, invece, il 9,5% è nel gruppo 1, il 14,3% nel gruppo 2 ed il 76,3% nel gruppo 3.

Per quanto riguarda l'antibiotico-resistenza di *S. pneumoniae* è stata dimostrata una percentuale di ceppi resistenti alla penicillina del 15%; questa resistenza era crociata a cotrimossazolo, tetraciclina e macrolidi. I ceppi di *S. aureus* erano meticillino-sensibili, ma tutti produttori di β -lattamasi.

La produzione di β -lattamasi era del 14% in *H. influenzae*, del 20% in *H. parainfluenzae* e del 100% in *M. catarrhalis*. Ceppi resistenti venivano riscontrati oltre che per amoxicillina anche per cotrimossazolo e tetraciclina.

I germi più isolati nel gruppo 3 erano *E. coli* e *K. pneumoniae*: la produzione di β -lattamasi era del 44% e del 80% rispettivamente. Due ceppi di *K. pneumoniae* producevano ES β L.

Lo studio ha dimostrato che nella riacutizzazione della bronchite cronica l'eziologia batterica è chiaramente correlata al VEMS e pertanto alla gravità della malattia.

STUDIO FENOTIPICO E GENOTIPICO DI 25 CEPPI DI *BLASTOSCHIZOMYCES CAPITATUS*

Caracciolo C¹, Alfonsetti G¹, Pontieri E¹, Bianchini S¹, D'Antonio D², Romano F³, Cedia T¹ e Oliva B¹.
*Università di L'Aquila*¹, *Ospedale S. Spirito (PE)*², *Università di Chieti*³

Negli ultimi anni lo spettro dei miceti che possono causare micosi disseminate in pazienti neutropenici si è notevolmente ampliato. Gli organismi più spesso responsabili di tali infezioni appartengono al genere *Candida*, ma nuove specie fungine si stanno affermando come patogeni emergenti. Tra tali specie viene annoverato il *B. capitatus* che si trova normalmente nell'ambiente ed associato all'uomo come commensale (cute, tratto gastrointestinale e respiratorio) e può rappresentare una grave complicanza in pazienti con emopatie maligne.

Questo studio è consistito nella caratterizzazione fenotipica (produzione di aspartil proteinasi) ed ad un'analisi genotipica (Restriction Endonuclease Analysis, REA ed analisi del cariotipo mediante Pulsed Field Electrophoresis) di 25 isolati clinici di *B. capitatus* provenienti da diverse zone d'Italia (19), dall'Olanda (2), dalla Germania (2) e dall'Inghilterra (2). Nove dei 25 ceppi analizzati sono registrati come ATCC. Per ciò che riguarda l'analisi per la secrezione di proteinasi acide solamente 2 campioni hanno mostrato una secrezione consistente ed uno debole, mentre i rimanenti 22 hanno mostrato valore negativo. Ciò suggerisce come la secrezione di proteinasi acide non sia per il *B. capitatus* un importante fattore di virulenza come invece accade per altri generi di miceti (*Candida*). IL REA è stato realizzato con gli enzimi di restrizione HpaII ed HinfI. Gli isolati sono stati raggruppati in classi comprendenti ciascuna quelli che presentavano lo stesso pattern di restrizione. Le classi individuate sono 6 con l'enzima HpaII e 7 con HinfI. Le classi individuate con ciascuno dei due enzimi di restrizione sono del tutto sovrapponibili ad eccezione di una differenza che riguarda solamente 2 campioni. Il cariotipo elettroforetico mostra come i campioni analizzati presentano tutti 3 bande cromosomiche, ad eccezione di un campione che ne presenta 4. La grandezza molecolare di tali bande è stata determinata mediante il programma GELS software ver. 3.1 (Bio-Rad) ed è compresa tra 2,6 e 6 Mbp. La variabilità riscontrata nel cariotipo elettroforetico è superiore rispetto a quella riscontrata nel REA, le classi individuate dal confronto delle bande cromosomiche presentate dai diversi campioni sono, infatti, 15.

QPCR OF AN UNCULTURED ENDOPHYTIC BACTERIUM ASSOCIATED WITH THE TRUFFLE *TUBER BORCHII* VITTAD.

Barbieri Elena, Giulia Riccioni, Sabrina Zeppa, Davide Sisti and Stocchi Vilberto

Istituto di Chimica Biologica "Giorgio Fornaini", Via Saffi 2, University of Urbino, 61029 Urbino, ITALY - barbieri@uniurb.it

Ectomycorrhizal fungi are of considerable interest for forestry and agronomy and the ascocarps of some *Tuber* species, commonly called truffles, are edible and of great demand due to their organoleptic properties. However, many aspects of the biology and ecology of these fungi are still unknown and a further level of complexity is added by the presence of microorganisms in the mycorrhizosphere as well as in the fungal fruit body, ectomycorrhiza and mycelium. Several bacteria have been recently isolated from the fruit body of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* and identified as *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Streptomyces*. In particular, an uncultured endophytic bacterium belonging to the *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylogroup have been previously found in four mycelium strains of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. (Barbieri et al., 2000). In this study, we extended our investigation in order to estimate the abundance of this uncultured bacterium within the fungal tissue using a competitive/quantitative PCR. In addition *Sphingobacterium heparinum*, the phylogenetically most close related culturable bacterium, was chosen for a comparative analysis in 16S rRNA gene (rDNA) amplification rates. The number of the endophytic bacterium 16S rDNA was estimated to be 3×10^3 copies per 1 month-old fungal culture. This represents the first estimation of 16S rDNA copies from an endophytic bacterium in an ectomycorrhizal fungus.

Barbieri, E., Potenza, L., Rossi I., et al., 2000. Appl. Environ. Microbiol. (66) 11: 5035-5042.

MOLECULAR APPROACHES FOR THE DETECTION OF TRUFFLE SPECIES IN PROCESSED FOOD PRODUCTS

A. Amicucci, C. Guidi, A. Zambonelli*, L. Potenza, E. Barbieri and V. Stocchi

Istituto di Chimica Biologica "Giorgio Fornaini", Università degli Studi di Urbino, Urbino (PU), Italy

*Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università di Bologna, Bologna, Italy

E-mail: a.amicucci@uniurb.it

Truffles are known above all for the organoleptic properties of the fruitbodies of several species, including *Tuber magnatum* Pico, *T. borchii* Vittad., *T. melanosporum* Vittad. and *T. aestivum* Vittad.. Truffles, and of other edible fungi, are sold both fresh and as conserved cooked products (canned, frozen, dried, etc.) such as cremes, patè or as a flavouring added to pasta, rice, cheese, sausages, etc.

In our research, molecular identification techniques were applied to analyse food products containing edible mushrooms and truffle species. The DNA fungal samples were processed by analyses of the ITS region. PCR using truffle species-specific primers, multiplex PCR, RFLP analysis, sequencing of the ITS region and specific oligonucleotide probe hybridisation were used. The analyses confirmed the presence of the prized truffle in some food products, and highlighted the fraudulent use of other, less-prized species.

The results reported herein demonstrate that the molecular identification methods offer enormous advantages in the identification of food products containing truffles or other edible fungi, in that **1** - their high sensitivity allows a reliable identification even when starting from minimum amounts of sample or degraded DNA; **2** - the method can be successfully applied to analyse samples with morphological features that have been highly altered due to the drastic treatments utilised for food preparation or to the use of unripe fruitbodies (lacking spores); **3** - such strategies have important applications in the analysis of food product, in both the preparation and commercialisation phases, in attempt to avoid and reveal commercial frauds and detect the possible presence of toxic fungi or truffles.

1. Amicucci A, Zambonelli A, Giomaro G, Potenza L and Stocchi V, Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Mol Ecol* **7**: 273-277 (1998).
2. Amicucci A, Guidi C, Zambonelli A, Potenza L and Stocchi V, Multiplex PCR for the identification of white *Tuber* species. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 265-269 (2000).

MALATTIE INTESTINALI ASSOCIATE A *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* (CDAD): VALIDITÀ E LIMITI DEL NOSTRO ATTUALE PROTOCOLLO DIAGNOSTICO.

Rossi S., Bertoncini L., Covan S., Somenzi P., Menozzi M.G., Chezzi C., Dettori G.

Sez. di Microbiologia-Dip. di Patologia e Medicina di Laboratorio, Univ. di Parma

C. difficile tossinogenico è causa di diarree nosocomiali in particolare nei pazienti anziani; nei neonati la percentuale dei portatori del batterio e/o delle sue tossine è alta con bassa incidenza della malattia. Di recente è stato segnalato un nesso eziologico tra isolamento di ceppi produttori della sola tossina B (TcdA-B+) e stato di malattia. Pertanto è parso opportuno rivedere le attuali procedure diagnostiche: ricerca della glutammato deidrogenasi (GDH), della enterotossina A (Tox A) ed isolamento di *C. difficile* dal campione di feci. Su ogni campione è stata eseguita la ricerca di GDH e Tox A rispettivamente con Culturette Brand CDT Rapid *C. difficile* Test e con ImmunoCard Toxin A (Meridien; "protocollo routinario") nonché con un saggio in grado di rilevarle simultaneamente (TRIAGE Micro *C. difficile* panel- Biosite). Il sistema di riferimento utilizzato nel confronto include la ricerca della citotossina B su cellule Vero e la verifica della tossigenicità dei ceppi isolati. Di 95 campioni fecali 45 hanno mostrato un saggio di citotossicità positivo (47,4%) e da 27 è stato isolato *C. difficile* (28,4%). Di questi ceppi 23 sono risultati TcdA+B+ (85,2%), 2 sembrano essere TcdA-B+(7,4%) e 2 TcdA-B- (7,4%). I risultati ottenuti hanno indicato una minore sensibilità ed una più elevata specificità di TRIAGE nel rilevare GDH e Tox A rispetto al nostro sistema routinario. Differenze non significative sono state riscontrate nel predire con Triage i casi positivi (100% vs 96,1%) e negativi (62,9% vs 65,6%). I valori di concordanza nell'indicare lo stato di malattia (CDAD) soprattutto nei pazienti adulti sono risultati paragonabili. Analizzando i dati clinici e di laboratorio è stata rivista la veridicità dei risultati discrepanti; 7 su 19 campioni di 53 pazienti con CDAD sono rimasti con risultati "Falsi negativi". Nell'ambito di soggetti sintomatici senza un sospetto clinico di CDAD, 15 pazienti hanno avuto campioni con risultati "Falsi positivi": nel 40% dei casi la presenza di GDH, rilevata con entrambi i sistemi, ha indicato precocemente lo stato di portatore di *C. difficile* TcdA-B- e TcdA+B+. L'introduzione della ricerca simultanea di GDH e ToxA, seguita dalla ricerca di Tox B (saggio di conferma) nei casi GDH+ToxA-, consente di porre una corretta diagnosi eziologica nonché di individuare lo stato di portatore nell'obiettivo di contribuire alla prevenzione di infezioni nosocomiali nelle popolazioni a rischio.

VALUTAZIONE DI UNA DOPPIA REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE GENICA (NESTED-PCR) PER LA DIAGNOSI DI MALARIA DI IMPORTAZIONE.

¹Dettori G., ²Perandin F., ¹Piccolo G., ¹Calderaro A., ¹Galati L., ²Pinsi G., ²Gargiulo F., ³Ricci L., ¹Medici M.C., ¹Arcangeletti C., ²Manca N. e ¹Chezzi C.

¹Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma; ²Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio-Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia; ³Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia.

E' stata valutata una doppia reazione di amplificazione genica (nested-PCR) per la ricerca e l'identificazione di plasmodi della malaria in 230 soggetti (127 stranieri e 103 italiani) con sospetto clinico di malaria di importazione e i risultati sono stati comparativamente analizzati con quelli ottenuti mediante l'esame microscopico. Il DNA estratto dai campioni di sangue è stato sottoposto ad una prima reazione PCR mediante l'impiego di 1 coppia di "primers" per l'amplificazione di una regione del DNA di 1.2 Kb, codificante per il gene ribosomale 18S comune ai 4 plasmodi di interesse medico. Il prodotto ottenuto dalla prima amplificazione è stato sottoposto a 4 reazioni PCR ognuna delle quali prevede l'utilizzo di coppie di "primers" specie-specifici per l'amplificazione di differenti regioni del DNA rispettivamente di *P. falciparum* (205 pb), di *P. vivax* (120 pb), di *P. malariae* (144 pb) e di *P. ovale* (800 pb). L'esame microscopico ha rivelato 76 infezioni singole (60 *P. falciparum*, 10 *P. vivax*, 3 *P. malariae*, 1 *P. ovale*, 1 *P. vivax* o *P. ovale* e 1 *P. vivax* o *P. falciparum*), mentre la nested-PCR ha rivelato complessivamente 83 infezioni, 72 singole (58 *P. falciparum*, 7 *P. vivax*, 2 *P. malariae* e 6 *P. ovale*) e 10 miste (5 *P. falciparum*+*P. vivax*; 3 *P. falciparum*+*P. malariae*, 1 *P. falciparum*+ *P. ovale* e 1 *P. malariae*+*P. vivax*). L'analisi della sequenza genomica ha confermato l'identificazione dei plasmodi ottenuta mediante nested-PCR nei 52 campioni saggiati. I nostri risultati mostrano che la nested-PCR è un metodo più sensibile e specifico dell'esame microscopico per l'identificazione dei plasmodi in campioni clinici. Inoltre la nested-PCR ha consentito di rivelare 10 infezioni miste che non erano state rivelate mediante l'esame microscopico.

IDENTIFICAZIONE DI PLASMODI PRESENTI NEL SANGUE DI PAZIENTI CON MALARIA DI IMPORTAZIONE MEDIANTE REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE GENICA "REAL-TIME/PCR".

¹Perandin F., ¹Manca N., ²Piccolo G., ²Calderaro A., ²Galati L., ¹Pinsi G., ¹Gargiulo F., ²Medici M.C., ²Arcangeletti C., ²Dettori G. e ²Chezzi C.

¹Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio-Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia; ²Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma.

E' stata utilizzata una reazione di amplificazione genica "Real-time/PCR" per rivelare frammenti del DNA genomico di plasmodi in campioni di sangue di 37 pazienti con sospetta malaria di importazione. I risultati osservati sono stati confrontati con quelli ottenuti mediante l'esame microscopico, una doppia reazione di amplificazione genica (nested-PCR) e l'analisi della sequenza genomica. Il DNA estratto dai campioni di sangue è stato sottoposto a "Real-time/PCR" utilizzando tre coppie di "primers"/sonda per rivelare, rispettivamente, *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv) e *P. ovale* (Po). I "primers"/sonda sono stati scelti e disegnati con l'impiego del software PrimerExpress (Applera Italia) e la reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando lo strumento ABIPRISM 7700 (Applera Italia). Esito concordante è stato osservato valutando i risultati ottenuti mediante esame microscopico e "Real-time/PCR" in 33 dei 37 casi esaminati. Dei 4 casi discordanti, 2 positivi (1Pf, 1Pv o Po) all'esame microscopico erano 1 Pf+Pv e 1 Po mediante "Real-time/PCR", mentre due campioni negativi all'esame microscopico sono risultati essere positivi (1 Pf e 1 Pf+Pv) mediante il secondo. I risultati ottenuti mediante "Real-time/PCR" sono stati confermati mediante nested-PCR e analisi della sequenza genomica. Tutte e tre le coppie di "primers"/sonda non hanno mai dato cross-reattività e false positività (in ciascuna seduta è sempre stato introdotto un campione senza DNA "Not Template Control" che è risultato sempre negativo). Inoltre, la sensibilità del saggio è stata valutata utilizzando il DNA estratto da un campione positivo per *P. falciparum* (2% di parasitemia) opportunamente diluito (1:10-1:100.000) e sottoposto ad amplificazione: la positività è stata riscontrata anche alla più bassa diluizione (coeff. correl.= -0.998). La reazione "Real-time/PCR" da noi messa a punto, dimostratasi essere altamente sensibile, specifica e rapida (2-3 ore), costituisce un valido supporto all'esame microscopico per l'identificazione di plasmodi in campioni di sangue di pazienti con sospetta malaria, soprattutto nei casi con bassa parassitemia o nelle infezioni miste. Ulteriori studi sono in corso per la messa a punto anche della coppia di "primers"/sonda per la specie *P. malariae*.

IDENTIFICAZIONE DI PLASMODI PRESENTI NEL SANGUE DI PAZIENTI CON MALARIA DI IMPORTAZIONE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO CON ELETTROFORESI CAPILLARE.

¹Manca, N., ¹Perandin F., ²Piccolo G., ²Calderaro A., ²Galati L., ¹Pinsi G., ¹Gargiulo F., ²Medici M.C., ²Arcangeletti C., ²Dettori G. e ²Chezzi C.

¹Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio-Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia; ²Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma.

E' stata determinata la sequenza nucleotidica di frammenti del DNA genomico di plasmodi ottenuti dal sangue di pazienti con malaria di importazione. Il DNA estratto da 52 campioni di sangue di pazienti con malaria è stato sottoposto ad una doppia amplificazione mediante nested-PCR specie-specifica (Perandin *et al.*, 2001). L'analisi della sequenza nucleotidica del prodotto di amplificazione è stata eseguita dopo purificazione e quantificazione su gel d'agaroso al 2%, facendo uso di "terminatori" marcati con sostanze fluorescenti mediante il "Big Dye Terminator Sequencing kit (PE Biosystem, USA)" e degli stessi "primers" utilizzati per la nested-PCR. Gli amplificati così ottenuti sono stati analizzati con lo strumento ABIPRISM 310. I dati relativi alle sequenze nucleotidiche osservate sono stati confrontati con la sequenza "wild-type" delle quattro specie del genere *Plasmodium spp.* depositate in banca dati. L'analisi delle sequenze ha consentito di identificare: 39 ceppi di *P. falciparum*, 4 di *P. vivax*, 1 *P. ovale* e 1 *P. malariae*. Inoltre sono stati rivelati casi di infezioni miste da *P. falciparum* e *P. vivax* (4 casi), *P. falciparum* e *P. ovale* (1 caso), *P. falciparum* e *P. malariae* (1 caso), *P. vivax* e *P. malariae* (1 caso). Tutti i ceppi di *P. falciparum* identificati hanno mostrato una sequenza identica a quella "wild-type", mentre entrambi i ceppi di *P. malariae* e 3 ceppi di *P. vivax* singola infezione e 1 ceppo di *P. vivax* doppia infezione hanno mostrato delle mutazioni. In particolare, i 2 ceppi di *P. malariae* hanno presentato, in posizione 35 e 36, le basi CG invece di GC ed in posizione 111 la base G in luogo di A. I ceppi di *P. vivax* hanno presentato in posizione 55 la base G nel filamento 3'-5', e solo in un caso anche nel filamento 5'-3', in luogo della base T. I due ceppi *P. ovale*, a causa dell'amplificato troppo lungo (800 pb), sono stati sequenziati come singolo filamento e per entrambi non sono state osservate mutazioni nucleotidiche. Il sequenziamento mediante elettroforesi capillare ha confermato i risultati ottenuti dalla nested-PCR specie-specifica. Esso ha inoltre consentito di svelare piccole variazioni nella sequenza del DNA dei ceppi isolati rispetto a quelli "wild-type". Ulteriori studi sono in corso per accertare il significato delle mutazioni osservate.

REPLICAZIONE CRIPTICA DI HIV E FALLIMENTO TERAPEUTICO

Varnier Oliviero E., Bertolotti Francesca, Martini Isabella, McDermott Jennifer L.
Sezione di Microbiologia, DISCAT, Università di Genova.

L'impiego di un trattamento combinato di farmaci antiretrovirali ha consentito la soppressione della replicazione di HIV-1 nelle persone infette ottenendo livelli di RNA plasmatico non-quantificabili per oltre due anni. Nonostante quest'alta efficacia terapeutica, esiste una riserva del virus nei linfociti CD4+ quiescenti. Poiché l'interruzione della terapia causa un immediato aumento della viremia, che raggiunge i valori basali, è stato ipotizzato che una persistente replicazione criptica mantenga livelli non quantificabili o compartimentati di viremia responsabile di questo rebound. Inoltre una percentuale elevata di pazienti aviremici vanno incontro ad un fallimento terapeutico.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di verificare se la presenza di DNA 2LTR non integrato, che è presente esclusivamente nelle cellule infettate *ex novo*, possa identificare questa replicazione criptica in soggetti che presentano livelli di RNA plasmatico non-quantificabili.

Sono stati analizzati 171 campioni da 22 pazienti con viremia non quantificabile. Il plasma è stato aliquotato; i PBMC sono stati separati mediante gradiente di Ficoll-Hypaque, il DNA Totale è stato estratto mediante lisi cellulare. Una regione conservata del gene *gag*, presente in tutte le forme di DNA di HIV, è stata amplificata e il numero di copie di DNA per 10⁶ PBMC quantificate mediante lettura in cinetica del segnale colorimetrico. La presenza di DNA extra-cromosomale è stata dimostrata mediante amplificazione della giunzione U5-U3, che è presente solo nel DNA 2LTR non-integrato.

Il DNA Totale di HIV-1 è stato quantificato in 123 (72%) campioni con quantità variabili da 50 a 8,900 copie x10⁶PBMC, mentre era non-rilevabile nei rimanenti 48 campioni. La presenza di HIV DNA 2LTR Non-Integrato è stata osservata in 84 (68%) dei 126 campioni HIV DNA Totale-positivi. Per verificare se i 39 campioni 2LTR-negativi/DNA Totale-positivi e i 48 campioni 2LTR-negativi/DNA Totale-negativi erano "veri" negativi, la sensibilità del test è stata aumentata mediante concentrazione selettiva del DNA extracromosomale da una seconda aliquota di PBMC (2x10⁶ PBMC). Il DNA 2LTR è stato amplificato in 8 dei campioni 2LTR-negativi/DNA Totale-positivi e in 25 dei 2LTR-negativi/DNA Totale-negativi. Pertanto 117 dei 171 campioni di pazienti aviremici contenevano DNA 2LTR non-integrato.

Il messaggio drammatico di questo studio è che circa il 68% dei pazienti aviremici hanno un marcatore di attiva replicazione virale. La presenza di DNA 2LTR suggerisce che la terapia è inefficace e potrebbe anticipare il fallimento terapeutico.

Collaborazioni: F. Indiveri, F. Puppo, A. Campelli (Medicina Interna, DIMI, Genova); L. Tagliaferro (Lecce) e A. Cara (ISS, Roma).

RELAZIONI EVOLUTIVE E FREQUENZA DI CONIUGAZIONE DI TN 1546 E TN 1546-LIKE IN ENTEROCOCCUS SPP.

Floriana Campanile, Sonia Borbone, Fabio Di Bassiano, Maria Santagati e Stefania Stefani.

Dipartimento di Scienze Microbiologiche – Università degli Studi di Catania.

Email labmicge@mbox.unict.it

I trasposoni coniugativi sono considerati gli elementi mobili più “promiscui” in quanto trasferibili ad un’ampia varietà di specie. In *Enterococcus* spp. il cluster genico che conferisce alti livelli di resistenza alla vancomicina e teicoplanina (RSHAX) risiede sul trasposone coniugativo Tn1546, di dimensioni pari a 10.851bp. Recentemente sono stati identificati diversi isolati di VRE contenenti elementi Tn1546-like, che presentano l’integrazione di sequenze di inserzione note (IS1216V; IS1251). Il nostro studio si è posto come obiettivi: i) determinare gli eventi ricombinativi che causano eterogeneità nel cluster genico vanA, attraverso l’analisi dei polimorfismi del Tn1546 e l’individuazione dei diversi Tn-types; ii) valutare gli effetti dell’integrazione delle IS1216V ed IS1251 sulla frequenza di coniugazione dei ceppi in studio.

Da un campione di VRE sono stati selezionati 7 ceppi in cui Tn1546 ha subito diverse modificazioni, da delezioni più o meno estese delle flanking-regions destra e sinistra, alla delezione dell’intero gene della trasposasi (ORF1) e del gene vanY. I nostri risultati mostrano che l’eterogeneità dei RFLPs di Tn1546 è dovuta, principalmente, all’integrazione di IS1216V-like ed in un solo caso della IS1251; tali riarrangiamenti, che coinvolgono prevalentemente regioni intergeniche (vanX-vanY e vanS-vanH), non causano modificazioni nel fenotipo di resistenza. Eccezionalmente nel Tn-type J, la IS1216V si inserisce all’interno del gene funzionale vanS, coinvolto nel meccanismo di regolazione, non determinando alcuna variazione nel meccanismo di resistenza. Solo il ceppo con Tn-type A, *E. faecalis* GG, è stato in grado di trasferire il Tn1546 al ceppo ricevente *E. faecalis* JH2-2, con una bassa frequenza di coniugazione, mentre non è stato possibile trasferire l’elemento mediante coniugazione, con tutti gli altri ceppi in studio che presentavano riarrangiamenti o delezioni; tali risultati fanno ipotizzare che il Tn1546 subisca inserzioni e riarrangiamenti in maniera indipendente dalla sua trasposizione. I transconiuganti ottenuti dal ceppo con Tn-type A sono risultati positivi alla PCR con primers specifici per il gene vanA e per il gene tetM; l’osservazione che i transconiuganti ottenuti hanno acquisito la resistenza alla tetraciclina, oltre che alla vancomicina e teicoplanina, conferma come parecchi geni di resistenza possano essere trasferiti simultaneamente, in un unico evento coniugativo.

CORRELAZIONE TRA PRODUZIONE DI BIOFILM E PRESENZA DELL’OPERON-ICA IN ISOLATI DA CATETERE DI STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS.

Viviana Cafiso, Carmela Cascone, Viviana Gianninò e Stefania Stefani

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche- Università degli Studi di Catania- Italia.

E-mail: labmicge@mbox.unict.it

Staphylococcus epidermidis rappresenta uno dei principali patogeni nelle infezioni associate all’uso di cateteri o impianti polimerici. La patogenicità di questo microrganismo è dovuta alla sua capacità di vita sessile, realizzata mediante la produzione di un biofilm costituito da gruppi di cellule pluristratificate racchiuse in una sostanza extracellulare o slime (ESS), consistente prevalentemente di acidi teicoici della parete cellulare e prodotti dell’ospite. La formazione di biofilm si realizza in due fasi distinte: una rapida adesione delle cellule alla superficie del polimero dovuta alla proliferazione cellulare ed all’adesione intracellulare; una successiva fase di accumulo intercellulare. Quest’ultima viene attuata grazie ad un polimero di β -1,6 N-acetil-glucosamina detto “PIA” (polysaccharide intercellular adhesin) la cui produzione è correlata all’espressione di un operon, *ica*, comprendente i geni *icaA*, B, C, D. Recenti studi hanno messo in evidenza che l’integrazione e l’escissione della IS256 (elemento mobile presente sia come forma indipendente in copia multipla nel genoma che come estremità terminali del Tn4001 responsabile della gentamicina-resistenza) dai geni dell’operon funge da interruttore molecolare nella produzione di PIA.

Scopo di questo lavoro è stato quello di: analizzare l’organizzazione dei geni dell’operon *ica* in un campione di *S. epidermidis* isolato da catetere e da altro tipo di infezioni nosocomiale; ricercare la presenza della IS256 nel suddetto cluster genico; verificare la produzione di slime e biofilm; valutare i livelli di oxacillino-gentamicina-resistenza; correlare l’organizzazione dell’operon con la produzione di slime-biofilm ed i livelli di antibiotico-resistenza.

L’amplificazione dei geni dell’operon mostra ampliconi di dimensioni attese dei geni *icaA*, B, C rispettivamente di 814, 526, 989 bp ed ampliconi di dimensioni aumentate di circa 1300 bp giustificabili dall’inserzione della IS256. L’inserzione di questa IS in *ica* operon presenta un hot spot in *icaA*. Sono presenti, inoltre, delle differenti organizzazioni dei geni dell’operon: accanto a ceppi che presentano ampliconi attesi o con inserzione della IS256, ve ne sono altri con IS ed ampliconi di *icaB* di dimensioni di 700 bp non spiegabili con l’inserzione di alcun elemento. I saggi di produzione di slime e biofilm mettono in risalto che i ceppi con un’organizzazione genica standard sono produttori sia di slime che di biofilm, mentre non lo sono né i ceppi con inserzione in *icaA* né i ceppi che presentano ampliconi inattesi. Tutti i ceppi isolati sia da catetere che da altro tipo di infezioni nosocomiali presentano lo stesso tipo di comportamento in tutti i saggi valutati.

Una stretta correlazione è, inoltre, presente tra i bassi livelli di gentamicina-resistenza, produzione di biofilm ed inserzione della IS256 nel cluster genico *ica*.

PRESENZA DI DOPPI GENI RESPONSABILI DELLA RESISTENZA ALL'ERITROMICINA E LA LORO ESPRESSIONE IN *S.PYOGENES*.

Carmela Cascone, Maria Santagati, Gianni Pozzi* e Stefania Stefani

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche- Università degli Studi di Catania- Italia; * Università di Siena
E-mail: labmicge@inbox.unict.it

Negli anni '90 si è assistito ad un drammatico incremento dell'eritromicina-resistenza particolarmente in *S.pyogenes*, patogeno responsabile di numerose infezioni delle alte vie respiratorie. In Italia, la resistenza alla eritromicina ha raggiunto valori anche del 45%, distribuendosi equamente nei due principali meccanismi biochimici e precisamente la modificazione del bersaglio e l'efflusso. In *S.pyogenes*, il primo meccanismo di resistenza è ascrivibile a due determinanti di resistenza e precisamente *erm(B)*, appartenente alla classe dei geni *erm(B)* e, più recentemente *erm(TR)* della classe *erm(A)*. Per quanto riguarda il meccanismo ad efflusso dell'antibiotico, esso è associato alla presenza dei geni della classe *mef(A)*. Recentemente diversi autori hanno riportato la presenza di più geni di resistenza in un unico isolato clinico: in particolare in *S.pyogenes* è frequente l'associazione di *erm(TR)* sia con *mef(A)* che con *erm(B)*, esprimendo in tutti i casi un fenotipo MLS_B. Il nostro obiettivo è stato quello di studiare l'espressione di doppi determinanti di resistenza presenti in un campione di 9 ceppi di *S.pyogenes*, utilizzando come controlli un singolo isolato per ogni classe genica, rispettivamente *erm(B)*, *erm(TR)* e *mef(A)*.

Tutti i ceppi in studio mostravano un fenotipo di resistenza MLS_B di cui, 7 ceppi presentavano il gene *erm(TR)* associato ad *erm(B)* e solo in due ceppi *erm(TR)* era associato a *mef(A)*.

L'espressione genica ottenuta mediante RT-PCR ha messo in evidenza che gli ampliconi di 348 bp, 526 bp e di 800 bp per i rispettivi geni *mef(A)*, *erm(B)* ed *erm(TR)* erano tutti delle medesime dimensioni dei prodotti di PCR. I 3 isolati che contenevano il singolo determinante di resistenza esprimevano ciascuno il proprio gene, confermando il fenotipo atteso. Nei 7 ceppi con fenotipo MLS_B e con genotipo *erm(B)* associato ad *erm(TR)*, quest'ultimo è risultato sempre espresso, mentre solo due ceppi lo esprimono in associazione ad *erm(B)*. Infine i 2 ceppi con fenotipo MLS_B e genotipo *mef(A)* associato ad *erm(TR)*, entrambi i geni vengono espressi. I risultati da noi ottenuti mostrano che *erm(TR)*, pur essendo un gene di origine recente in *S.pyogenes*, è abbastanza diffuso ed è funzionale anche se associato agli altri geni, diversamente da quanto messo in evidenza per *erm(B)*. La presenza di geni associati capaci di determinare lo stesso tipo di resistenza ed, in alcuni casi, anche lo stesso fenotipo, ma con meccanismi differenti, ci propone un modo nuovo di affrontare lo studio delle resistenze, le loro espressioni e la loro mobilità.

TN 1207.3, NUOVO TRASPOSONE CONIUGATIVO CHE VEICOLA MEF(A) IN UN ISOLATO CLINICO DI *S.PYOGENES*.

Santagati M., Iannelli F*, Cascone C. Campanile F., Oggioni M*, Pozzi G*, e Stefani S.

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche- Università degli Studi di Catania- Italia. * Università di Siena
E-mail santagatim@tiscali.it

I geni *mef(A)* e *mef(E)* appartenenti alla classe genica *mef(A)*, codificano un sistema di pompa ad efflusso, che conferisce un fenotipo di resistenza M caratterizzato da bassi livelli di resistenza ai macrolidi a 14-15 atomi e sensibilità alle lincosamidi e streptogramine di tipo B. Questi geni, sono stati ritrovati in una grande varietà di batteri Gram-positivi del genere *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*. Recentemente in un isolato clinico di *S.pneumoniae*, è stato caratterizzato l'elemento genico che veicola *mef(A)*, Tn1207.1, di 7244 bp, che si integra in un sito specifico di *celB* sul genoma batterico. Si è dimostrato, inoltre, che esso non è trasferibile per coniugazione. Obiettivo del nostro studio è stato quello di caratterizzare l'elemento mobile che veicola *mef(A)* in un isolato clinico di *S.pyogenes* 2812A, sulla base delle conoscenze sull'organizzazione genica del Tn1207.1, al fine di valutarne le dimensioni, la trasmissibilità ed il relativo punto d'integrazione sul genoma. L'analisi della sequenza nucleotidica fiancheggiante *mef(A)* nell'isolato clinico di *S.pyogenes* 2812A mostra che le 7244 bp dell'estremità sinistra sono identiche al Tn1207.1 con la medesima organizzazione genica, mentre la regione destra appare di dimensioni maggiori. Il nuovo elemento genetico denominato Tn1207.3, ha dimensione pari a 52 kb, ottenute mediante analisi delle dimensioni dei frammenti d'ibridazione *celB/sacII* e presenta un sito d'integrazione specifico sul cromosoma di *S.pyogenes*. Tn1207.3 è stato trasferito in un ceppo di *S.pneumoniae*, DP1002, i transconiuganti ottenuti mostravano tutti un fenotipo M di resistenza ed uno stesso punto d'integrazione sul genoma dello pneumococco uguale a quello ritrovato per Tn1207.1. Infine utilizzando il transconiugante MF2, Tn1207.3 è stato trasferito in *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, e *S.gordonii*. In conclusione Tn1207.1 precedentemente descritto in *S.pneumoniae* può essere considerato difettivo e parte di un elemento più complesso quale Tn1207.3.

INHIBITION OF RESISTANCE AND PATHOGENICITY OF ITRACONAZOLE RESISTANT *CANDIDA ALBICANS* BY BUTYLATED HYDROXYANISOLE.

G. Simonetti, A. Villa, N. Simonetti*

Istituto di Microbiologia Facoltà di Farmacia

Università di Roma "La Sapienza"

Piazzale Aldo Moro 5 00185 ROMA Italia

Summary.

Antifungal resistance together with hyphal formation and cell surface hydrophobicity status play an important role in the pathogenicity of *Candida albicans*.

The minimum inhibition concentrations of Itraconazole for 10 resistant *Candida albicans* strains, determined by a broth macrodilution method, with RPMI 1640 medium, are $\geq 126 \mu\text{g/ml}$ and at subinhibitory concentrations are manifested hyphal structures. We have demonstrated that butylated hydroxyanisole, at subinhibitory concentrations, decrease 500 times the MIC values of itaconazole and inhibits to greater extent the hyphal growth of *Candida albicans*. The butylated hydroxyanisole decreases hyphal growth also in no coltural medium such phosphate-citric acid buffer + N-acetyl-D-glucosamine.

Pretreatment of yeast cells, with subinibitory butylated hydroxyanisole concentration, reduced the cell surface hydrophobicity and inhibited the hyphal growth.

The butylated hydroxyanisole seem to favour itraconazole activity by increasing the cell membrane permeability; pretreatment with subinhibitory butylated hydroxyanisole concentrations really increased the heat sensitivity of the cells and the permeability of viable cells to methylene blue.

EFFICACIA DELL' ADSORBIMENTO DI ANTIBIOTICI PER LA PREVENZIONE DELLE INFEZIONI ASSOCIATE AI CATETERI: NUOVI APPROCCI SPERIMENTALI.

G. Donelli¹, I. Francolini^{1,2}, W. Marconi², A. Piozzi²

Laboratorio di Ultrastrutture¹ Istituto Superiore di Sanità e Dipartimento di Chimica² Università "La Sapienza", Roma.

L'uso di cateteri centrali venosi per la somministrazione di sostanze nutritive e/o farmaci e per il monitoraggio dello stato emodinamico dei pazienti è diventato indispensabile nella pratica clinica moderna. Sfortunatamente, al loro uso sono associate varie complicazioni, la più comune delle quali risulta essere l'insorgenza di infezioni. Annualmente, negli USA si calcola che il 90% dei casi di infezioni del circolo sanguigno è correlato all'uso di dispositivi intravascolari. Queste infezioni sono associate ad un aumento di mortalità, oltre che ad una crescita dei costi sanitari derivanti dal prolungamento del tempo di ospedalizzazione. Negli ultimi anni, gli approcci sperimentali mirati alla prevenzione delle infezioni catetere-correlate sono stati molteplici, il più promettente dei quali sembra essere il ricoprimento della superficie dei cateteri con sostanze antimicrobiche. Il presente lavoro si inserisce nell'ambito di questa sperimentazione ed ha avuto come scopo l'adsorbimento di un antibiotico b-lattamico, il cefamandolo nafato (CEF), su poliuretani segmentati e su polimeri a base vinilica diversamente funzionalizzati al fine di favorire l'impregnazione del farmaco. Sono stati quindi introdotti gruppi acidi (carbossili), gruppi basici (ammine terziarie), gruppi carichi positivamente (ottenuti per quaternizzazione dei gruppi amminici terziari), gruppi idrofilici non carichi (ossidrilici) e gruppi fortemente acidi (solfato). I polimeri sintetizzati sono stati caratterizzati mediante misure chimiche e chimico-fisiche condotte sia in superficie che in bulk. La capacità antibatterica delle superfici trattate con l'antibiotico è stata verificata sia mediante osservazione al microscopio ottico che con il test biologico di Kirby Bauer, impiegando come microrganismo sensibile lo *Staphylococcus epidermidis*, patogeno tra i più frequentemente isolati nei casi di infezione correlata ai cateteri. L'aver ottenuto polimeri con molecole di antibiotico adsorbite in superficie che all'interno della matrice polimerica si è rivelata una importante strategia per prolungare nel tempo la capacità antibatterica dei polimeri potenzialmente utilizzabili per la realizzazione di cateteri antimicrobici.

SENSIBILITA' DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS ALLA METICILLINA E AI GLICOPEPTIDI

Monno R.¹, De Vito D.², Costi A.¹, Coscia F.², Ceci G.², Rizzo G.²

¹ Cattedra di Microbiologia Clinica e ² Cattedra di Igiene, Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica - Sezione di Igiene. Università degli Studi di Bari Policlinico. P. G. Cesare, Bari.

Scopo della ricerca: Determinare l'incidenza di *S. aureus* meticillino resistenti (MRSA) e la loro sensibilità alla vancomicina e alla teicoplanina.

Materiali e Metodi: Sono stati saggiati 286 ceppi di *S. aureus* isolati da vari materiali clinici provenienti dai reparti del Policlinico di Bari. La resistenza alla meticillina fu determinata mediante metodi automatizzati (MicroScan, Dade Behring), oxacillina agar screen, determinazione della PBP 2' con metodica di agglutinazione al lattice (Oxoid S.p.A.) e determinazione delle MICs mediante agar diluizione in M-H addizionato di NaCl. La sensibilità alla vancomicina e alla teicoplanina fu valutata mediante metodi automatizzati e mediante determinazione della MIC con agar diluizione.

Risultati: 119 dei 286 ceppi di *S. aureus* testati (41.6%) sono risultati MRSA sia con il sistema MicroScan che con la determinazione della PBP 2'. La MIC 50 e la MIC 90 per la oxacillina sono risultate rispettivamente 1 mg/L e 256 mg/L (range compreso tra 0.125 mg/L e 256 mg/L). E' stata rilevata una stretta correlazione tra elevati valori della MIC e presenza di PBP2': il 37% dei ceppi produttori di PBP2' avevano una MIC di 256 mg/L. Gli MRSA hanno rappresentato le seguenti percentuali dei ceppi isolati da: sangue (71.4%), catetere venoso (67%), pus (51.2%), secreti bronchiali (51%), urine (44%), tampone ferita (40.2%), tamponi naso-faringei (8%). Gli MRSA furono isolati prevalentemente dai seguenti reparti: Terapia intensiva (76.5%), Chirurgia plastica (72%), Cardiocirurgia (55.5%), Chirurgia generale (45%), Ortopedia (40%), Medicina (35.4%), Pediatria (9.4%).

Sia i ceppi MRSA che i ceppi MSSA risultarono sensibili alla vancomicina (MIC 50: 1 mg/L; MIC 90: 2 mg/L, range 0.125 - 4 mg/L). Per la teicoplanina sono stati riscontrate MIC 50: 2 mg/L e MIC 90: 4 mg/L (range 0.125- 8 mg/L). La sensibilità ai glicopeptidi è stata confermata anche con il sistema automatizzato.

Conclusioni: Anche nella nostra esperienza i ceppi MRSA rappresentano circa il 40% dei ceppi isolati in ambiente ospedaliero e questi dati sono in accordo con quelli riportati da altri Autori in Italia. Attualmente sembra che non ci siano resistenze alla vancomicina, anche se sono in progress studi per valutare la presenza di subcloni hVISA.

MODULAZIONE DELLE PROTEINE PARIETALI IN PRESENZA DI DOSI SUB-INIBITORIE DI FLUCONAZOLO E DI FK 463 IN *CANDIDA ALBICANS*.

L. Angiolella¹, M.M. Micocci¹, A. Girolamo², A. Cassone².

¹Istituto di Microbiologia, Facoltà di Farmacia, Univ. "La Sapienza" Roma.

²Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica. Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Le principali proteine associate al glucano (GAP) della parete cellulare di diversi isolati sensibili e resistenti al fluconazolo ed un nuovo antimicotico glicopeptidico FK 463 in *Candida albicans* sono state identificate sequenziando direttamente le bande proteiche di un gel elettroforetico. Sono stati studiati i cambiamenti nella composizione delle GAP dei differenti ceppi anche in presenza di dosi subinibitorie di fluconazolo e di FK 463.

Nei ceppi sensibili le maggiori GAP rappresentate sono l'enolasi (46 kDa), due isoforme di fosfogliceromutasi (32 e 29 kDa) e due β 1-3 eso-glucanasi (44 e 34 kDa) di cui una la componente a 34 kDa è glicosilata. Quando questi ceppi sono cresciuti in presenza di dosi sub-inibitorie di fluconazolo, c'è una sostanziale diminuzione dei due enzimi del pathway glicolitico (enolasi e fosfogliceromutasi) e questa diminuzione è ancora più marcata in presenza di FK463. Questo pattern proteico mima ciò che si osserva nei ceppi resistenti indipendentemente dalla crescita in presenza o in assenza di farmaco. Sia l'enolasi che la glucanasi sono state rilevate nei terreni di coltura delle cellule trattate con farmaco insieme ad una grande quantità di materiale secreto altamente glicosilato, suggerendo quindi che il fluconazolo come pure FK463 causano marcate alterazioni dell'incorporazione delle GAP nella parete cellulare. In conclusione siamo stati in grado di identificare tutti i principali componenti delle GAP e seguire la loro distribuzione nei trattamenti con il fluconazolo ed FK463. La similitudine dei profili delle GAP dei ceppi sensibili cresciuti in condizioni subinibitorie di antimicotici con quelle dei ceppi resistenti suggerisce che il farmaco moduli l'incorporazione delle proteine nella parete cellulare di *C. albicans* e questa modulazione viene stabilmente incorporata nei ceppi resistenti. Infine, la somiglianza degli effetti sulle GAP di due antimicotici così diversi per il meccanismo d'azione quali il fluconazolo ed il glicopeptide suggerisce trattasi di una risposta allo stress cellulare.

I CIANOBATTERI QUALI PRODUTTORI DI METABOLITI ATTIVI PER IL CONTROLLO DI PATOGENI RADICALI

Mario R. Tredici

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università degli Studi di Firenze

P.le delle Cascine, 24 – 50144 Firenze

I cianobatteri, un gruppo di microrganismi procarioti a fotosintesi ossigenica utilizzati da decenni in Asia come biofertilizzanti nelle risaie, hanno di recente suscitato un notevole interesse quali produttori di antitumorali per l'industria farmaceutica e di biocidi (fungicidi, insetticidi, nematocidi) per l'agricoltura (Kulik, 1995; Borowitzka, 2000).

Presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie di Firenze sono iniziate da alcuni anni ricerche sulle molecole bioattive da cianobatteri con particolare attenzione al loro uso come antibiotici ed antitumorali e come fungicidi per l'agricoltura. Un primo screening condotto su 50 ceppi del genere *Nostoc* ha evidenziato una diffusa presenza di attività antifungina (Piccardi *et al.*, 2000) ed, in misura minore, insetticida e nematocida. Alcuni dei ceppi di maggiore interesse per potenza e spettro di inibizione sono stati coltivati in reattori da 120 litri con illuminazione artificiale (Rodolfi *et al.*, 2001). Per questi ceppi si sono messe a punto le metodiche di estrazione ed è iniziata la caratterizzazione chimica dei principi attivi (Piccardi *et al.*, 1999). Inoltre è in corso di verifica l'efficacia di biomasse ed estratti grezzi nel controllo dei microrganismi target, sia in presenza che in assenza della pianta ospite. Le interazioni delle molecole bioattive con la componente biotica ed abiotica (es. colloidali organici ed inorganici) del suolo saranno oggetto di ulteriori studi.

Gli studi fin qui condotti, oltre a confermarne il notevole potenziale, hanno messo in luce alcuni limiti di questo gruppo microbico. In particolare, la necessità di notevoli quantità di biomassa per la purificazione e la caratterizzazione delle molecole attive, e successivamente per i test preclinici e clinici o per le prove in campo, appare uno dei maggiori ostacoli allo sfruttamento dei cianobatteri bioattivi nei settori farmaceutico ed agrario. Tali considerazioni hanno orientato le nostre ricerche verso la messa a punto di nuove e più economiche tecnologie di coltura in reattori chiusi di grandi dimensioni (da 120 a 2500 L) ed in grado di sostenere una produzione massiva in condizioni di illuminazione naturale. Si sono inoltre prese in considerazione le problematiche connesse con la tossicità delle biomasse e dei mezzi di coltura esausti, e quindi i possibili rischi per la salute degli operatori. Al fine di massimizzare la produzione dei principi attivi, sono iniziate ricerche orientate a chiarire l'influenza dei principali parametri di coltura sulla crescita del cianobatterio e la sintesi di metaboliti secondari, tra cui sono da comprendere la maggior parte delle molecole bioattive.

QUANTIFICAZIONE DI CMV DNA NEL PLASMA MEDIANTE REAL TIME PCR (LIGHTCYCLER)

McDermott Jennifer L., Martini Isabella, Bertolotti Francesca, Gianrossi Giovanna#, Grazi Grazia#, Ulivi Massimo*, Landt Olfert*, Varnier Oliviero E.

*Sezione di Microbiologia, DISCAT, Università di Genova, #U.O. Microbiologia Clinica, Osp. S. Martino, Genova, e *TibMolBiol, Berlino.*

L'infezione da CMV è caratterizzata da una infezione primaria seguita da una persistenza per tutta la vita e il potenziale patogeno si manifesta nell'ospite che presenta un'immunità compromessa: individui con infezione da HIV, pazienti trattati con farmaci immunosoppressivi o trapiantati. Sono necessari metodi sensibili e specifici per identificare un'infezione attiva. Recentemente è stato descritto che il LightCycler, strumento caratterizzato da un rapido ciclo termico con rilevamento fluorimetrico effettuato in massimo 45 minuti, è stato utilizzato nel monitoraggio della carica virale nel sangue periferico.

Poiché il numero dei leucociti (PBL) è fluttuante e la loro separazione è impegnativa, in questo studio è stata utilizzata la PCR real-time del LightCycler per la quantificazione di CMV DNA nel plasma, campione di facile raccolta e rapido trattamento.

Sono stati selezionati 13 campioni di sangue periferico positivi per l'antigene pp65 nei PBL, e 12 campioni pp65-negativi. Il plasma è stato separato ed aliquotato e i PBL sono stati separati per sedimentazione, contati ed aliquotati. Il DNA è stato estratto da 200 µl di plasma (circa 60 minuti) e da 2x10⁶ di PBL. I campioni di plasma e PBL contenevano 100 ng di DNA per consentire una analisi comparativa standardizzata. Una regione altamente conservata (254bp), codificante la glicoproteina B, è stata quantificata con i primers specifici gpB-for e gpB-rev, una sonda donatrice marcata al 3' con fluoresceina e una sonda accettrice marcata al 5' con LC-RED 640, come riportato precedentemente.

Tutti i campioni pp65-positivi sono stati confermati mediante Real-Time PCR nei campioni di plasma, mentre due campioni di PBL erano CMA DNA negativi. La sensibilità superiore della PCR rispetto all'antigenemia è stata dimostrata dal rilevamento di CMV DNA in quattro campioni pp65-negativi. I livelli di CMV DNA osservati nei campioni di plasma erano più alti rispetto a quelli dei PBL, con un'unica eccezione, e il CMV DNA è stato quantificato solo nel plasma in tre campioni.

Questi risultati preliminari dimostrano che la PCR Real-Time con il LightCycler può essere effettuata nei campioni di plasma con sensibilità e tempi rapidi (massimo due ore) tali da consentire il frequente monitoraggio quantitativo della viremia di CMV in pazienti trapiantati.

ELEMENTI DI INSERZIONE IN NEISSERIA MENINGITIDIS

Eliana De Gregorio, Chiara Abrescia, M. Stella Carlomagno e Pier Paolo Di Nocera

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare L. Califano Università degli Studi di Napoli Federico II
Via S. Pansini 5, 80131 Napoli

La disponibilità della sequenza nucleotidica completa di ceppi di *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* permette una analisi sistematica della organizzazione del materiale genetico in *Neisseria*. Il genoma del meningococco contiene un inusitato numero di classi di sequenze di DNA ripetute. Mediante analisi in silico, in vitro e in vivo [1,2] abbiamo definito alcune delle proprietà di un'abbondante classe di piccole sequenze di DNA di inserzione: gli elementi Correia o nemis (*Neisseria* Miniature Insertion Sequences).

I nemis sono elementi genetici mobili di 70-160 bp presenti in ca. 300 copie nei meningococchi di serogruppo A e B [1]. I nemis presentano ripetizioni terminali invertite (TIRs) di 26-27 bp, e sono evolutivamente correlati agli elementi RUP di *S. pneumoniae* [3]. Analisi in silico mostrano che ca 2/3 dei nemis sono inseriti a monte o a valle di geni noti o potenziali del meningococco. Monitorando l'espressione di sette differenti geni preceduti da nemis in un ceppo di serogruppo B di *N. meningitidis*, abbiamo osservato che l'estremità 5' dei trascritti è invariabilmente localizzata nelle sequenze TIRs [1]. L'ipotesi che i nemis siano cotrascritti con geni cellulari, e che i TIRs possano formare strutture di RNA a forcina clivate da enzimi cellulari è suffragata da analisi in vitro [2]. Trascritti radioattivi contenenti sequenze nemis sono specificamente processati a livello delle sequenze TIRs da estratti cellulari S-100 derivati da *E. coli* e *N. lactamica*. Utilizzando estratti cellulari da ceppi di *E. coli* contenenti mutazioni nei geni codificanti specifiche ribonucleasi, abbiamo dimostrato che il processamento è mediato dall'enzima Rnasi III [2].

I dati assegnano una funzione di controllo ad una abbondante classe di sequenze di DNA dispersa nel genoma di *N. meningitidis* e pongono le basi per l'identificazione sistematica dei geni regolati da Rnasi III in *Neisseria*. Poiché numerosi geni comuni al meningococco e gonococco sono fiancheggiati da nemis solo nel meningococco [1], è presumibile che eventi di processamento post-trascrizionale mediati da nemis determinino espressione differenziale di geni omologhi in differenti specie del genere *Neisseria*.

[1] Mazzone, et al. *Gene* (2001) in corso di stampa.

[2] De Gregorio et al., sottomesso per la pubblicazione.

[3] Oggioni e Claverys, *Microbiology* 145 (1999), 2647-2653.

UN NUOVO METODO PER LA VALUTAZIONE QUANTITATIVA DELLA CAPACITÀ ADESIVA DI BATTERI A SUPERFICI INERTI: SUA APPLICAZIONE PER L'ANALISI DELL'ADESIONE A NUOVI POLIMERI PER USO DENTALE.

Berlutti F.¹, P.Bosso¹, G.Antonini², A. De Rosa³, F. Rosso³, P.Valenti³

¹Dip. Scienze di Sanità Pubblica, Università di Roma "La Sapienza"; ²Dip. di Biologia, Università di Roma Tre ;

³Dip. Medicina Sperimentale, Università di Napoli

Differenti metodi microbiologici sono impiegati per la valutazione del fenomeno dell'adesione batterica alle superfici rigide. Tuttavia, la maggior parte di tali sistemi consente solo una stima qualitativa o semi quantitativa del fenomeno. Il metodo universalmente accettato per misurare quantitativamente una popolazione microbica è quello della conta su piastra; tale metodo è pienamente soddisfacente quanto i batteri si sviluppano in forma plantonica, ma risulta inadeguato quando i microrganismi sono adesi a superfici rigide.

In questo lavoro viene presentato un nuovo metodo biologico che consente di determinare il numero delle cellule batteriche adese a supporti rigidi. Il nuovo metodo si basa sulla rilevazione di una attività metabolica batterica mediante una reazione colorimetrica e correla il numero delle cellule batteriche presenti con il tempo necessario allo sviluppo della reazione colorimetrica. Dato che il tempo necessario allo sviluppo della reazione dipende sia dal numero delle cellule presenti che dal metabolismo del genere batterico adeso, sono state costruite curve standard di correlazione per ogni microrganismo utilizzato nei test di adesione. Il nuovo metodo è stato utilizzato per analizzare la capacità adesiva di *Streptococcus sobrinus* ATCC33478^T, *Streptococcus oralis* ATCC35037^T, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Escherichia coli* MG1655 ATCC47076 e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a quattro nuovi polimeri per uso dentale. I nuovi polimeri formati da HEMA, METAC e AMPS in proporzioni diverse si sono dimostrati suscettibili all'adesione. Esperimenti di cinetica di adesione hanno dimostrato che l'equilibrio di adesione viene raggiunto nella maggior parte dei casi tra 90 e 120 minuti di contatto in relazione al tipo di polimero e del tipo di batterio.

Il nuovo metodo di determinazione del numero di batteri adesi proposto si è dimostrato di facile esecuzione e particolarmente affidabile in quanto non richiede alcuna manipolazione del biomateriale con i batteri adesi.

SISTEMI DI AMPLIFICAZIONE GENICA NELLA RICERCA DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: CORRELAZIONE CON METODI TRADIZIONALI E VALUTAZIONE PROBABILISTICA DEL DATO

A. Lambiase, M. Del Pezzo, A. Lavitola

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Dip. Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare

Microbiologia Clinica

La recrudescenza mondiale della tubercolosi impone un contenimento della malattia che passa attraverso il riconoscimento precoce dei casi, il loro immediato trattamento e la ricerca dei contatti. Tuttavia la complessità patogenetica e la multiformità dei quadri morbosi rendono indispensabile la definizione di piani diagnostici che raccordino giudizio clinico e dati di laboratorio.

Ai classici metodi di colorazione e colturali se ne sono affiancati di più nuovi: auramina O, terreni di Middlebrook, Septi-Check, MGIT, MB-Redox, sistemi automatici (Bactec). I recenti sviluppi della biologia molecolare hanno consentito inoltre un potenziamento delle già ampie capacità analitiche del Laboratorio di Micobatteriologia: la Polymerase Chain Reaction (PCR) è ormai affiancata da sistemi in semiautomazione in grado di amplificare, anche direttamente sul campione biologico, sequenze genomiche specifiche. Tra questi il ProbeTec ET system della Becton Dickinson che amplifica in fase omogenea, sequenze di DNA (IS6110), con metodo di spiazzamento dello strand (SDA), controllo interno e rilevazione mediante trasferimento di energia fluorescente e l'AMTDT 2 Gen-Probe, che rivela sequenze di RNA ribosomiale, con metodo enzimatico isoterma mediato da trascrizione (TMA).

L'utilizzo di questi due sistemi su oltre 200 campioni, analizzati presso i nostri Laboratori, in parallelo cieco con metodiche tradizionali e sistemi colturali automatizzati, ha confermato la validità dei metodi di amplificazione genica nella ricerca diretta e nell'identificazione da coltura del *Mycobacterium tuberculosis*.

L'elaborazione statistica dei risultati, valutati sulla base degli esami colturali (1° standard), consiglia la revisione delle discordanze sulla base dei dati clinici (II standard). Il superamento delle frequenti discrepanze tra diagnosi clinica e dato di laboratorio è reso possibile dall'enunciazione dei risultati analitici in termini probabilistici, secondo principi e metodi di "technology assesment" e di "evidence based laboratory medicine". La preventiva enunciazione da parte del laboratorio del quoziente di probabilità (Likelihood Ratio) per classi di rischio, consentirà al clinico la valutazione dell'opportunità del ricorso al test e l'automatica correlazione del successivo dato analitico alla probabilità di malattia.

Finanziamento Regione Campania - P.O.P. 5.4.2 - Responsabile: A. Lavitola

STRUTTURA E REGOLAZIONE DELLA SEQUENZA DI INSERZIONE 1106 IN ISOLATI DI *N. MENINGITIDIS* PATOGENE E COMMENSALI

P. Salvatore, A. Lavitola, P. Alifano e C. B. Bruni

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano" - Università degli Studi di Napoli "Federico II" - Via S. Pansini 5, 80131 Napoli

L'attività dei trasposoni gioca un ruolo importante nel controllo della patogenicità del batterio *Neisseria meningitidis*. Sequenze di inserzione (IS) sono coinvolte, ad esempio, nella variazione di fase della capsula, e nella regolazione dell'espressione di geni di virulenza codificanti proteine della membrana esterna.

Abbiamo definito la struttura della IS1106, una sequenza di inserzione presente esclusivamente nel genoma delle Neisserie patogene ed abbiamo analizzato la regolazione della sua attività traspositiva in ceppi di *N. meningitidis* isolati da malati e da portatori sani. Il nostro lavoro ci ha permesso di definire un meccanismo di regolazione dell'attività di una IS mai descritto in precedenza. La trasposizione della sequenza di inserzione IS1106 è regolata da una proteina che funge da repressore della trasposizione. Questa proteina, denominata IS1106Tip è strutturalmente identica alla regione C-terminale della trasposasi, ed è in grado di legare le estremità invertite e ripetute (IR) della IS1106 con elevata affinità e specificità, competendo in tal modo con la trasposasi selvatica, anche in *trans*. Dal momento che il gene codificante IS1106Tip è attivo prevalentemente nei ceppi commensali, ed è inattivo nella maggior parte dei ceppi patogeni, è lecito ipotizzare che la sequenza di inserzione IS1106 sia maggiormente attiva in questi ultimi. La maggiore attività traspositiva della IS1106 nelle linee patogene di meningococco potrebbe aver contribuito ai riarrangiamenti genomici che hanno portato alla patogenicità.

CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DELLA PROTEINA M45 DEL CITOMEGALOVIRUS MURINO (MCMV)

Lembo D., Donalisio M., Cornaglia M., Riera L., Angeretti A., Landolfo S.

Dipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia, Università degli Studi di Torino

La ribonucleotidasi (RNR) è un enzima fondamentale per la sintesi del DNA in quanto catalizza la riduzione dei ribonucleotidi in desossiribonucleotidi (dNTP). Nella sua forma attiva è costituito da due subunità piccole (R2) associate a due subunità grandi (R1) che sono espresse esclusivamente in cellule proliferanti. Gli α - e γ -herpesvirus codificano per entrambe le subunità della ribonucleotidasi assicurandosi quindi un adeguato rifornimento di dNTP anche in cellule non proliferanti. Al contrario, i β -herpesvirus, tra cui il citomegalovirus (CMV), codificano esclusivamente per un omologo della subunità R1, non esprimendo quindi una RNR virale funzionale. Lo scopo della nostra ricerca è stato pertanto quello di chiarire come il CMV possa ottenere sufficienti livelli di dNTP in cellule non proliferanti e di definire la funzione della subunità R1 virale.

La sensibilità dell'MCMV all'idrossiurea, un noto inibitore della RNR, e l'osservazione che l'infezione virale induce alti livelli di R2 cellulare e modesti livelli di R1 cellulare suggeriscono che il CMV sfrutti l'attività della RNR cellulare per la propria replicazione. Il gene M45 presente nel genoma dell'MCMV codifica per una proteina che mostra una parziale omologia con le subunità R1 di altri herpesvirus. Tuttavia l'assenza di alcuni residui catalitici rende improbabile che tale proteina possa comportarsi come una subunità funzionale e suggerisce che possa avere acquisito una nuova funzione. Gli studi di cinetica di espressione e di localizzazione intracellulare dimostrano che la proteina M45 è citoplasmatica e viene espressa a partire da 24 ore dall'infezione. In esperimenti di co-immunoprecipitazione la M45 si ritrova associata alla R2 ma non all'R1 cellulare. Tuttavia i saggi enzimatici condotti *in vitro* aggiungendo R2 ricombinante alla M45 immunopurificata da cellule infettate dimostrano che tale associazione non dà luogo ad una attività RNR. Per definire il ruolo della proteina M45 nel processo replicativo virale abbiamo studiato le caratteristiche di crescita di virus mutanti con inattivazione funzionale del gene M45. I risultati ottenuti dimostrano che la proteina M45 è necessaria per una efficiente replicazione virale in cellule quiescenti. Sembra, in conclusione, che la proteina M45 pur avendo perso un'attività catalitica, abbia mantenuto un ruolo regolativo nella produzione di dNTP che risulta importante durante la replicazione virale in cellule non proliferanti.

VALUTAZIONE DEI MICRORGANISMI AERODISPERSI PROVENIENTI DA ATTIVITÀ DI COMPOSTAGGIO. STUDIO DI UN CASO.

M. Rodolfi¹, P. Grisoli², A. M. Picco¹, E. Grignani³, D. Cottica³, C. Dacarro².

¹Dip. di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, sez. di Micologia, Università degli Studi di Pavia. ²Dip. di Farmacologia Sperimentale ed Applicata, Lab. di Microbiologia, Università degli Studi di Pavia. ³Fondazione S. Maugeri, Clinica del Lavoro e della Riabilitazione IRCCS, Pavia. (Corr. author: Cesare Dacarro, fax +39 0382 507405, e-mail: dacarro@unipv.it)

È stata condotta un'analisi quantitativa e qualitativa dei microrganismi aerodispersi nell'area circostante un impianto di compostaggio. Il monitoraggio è stato realizzato nell'arco di quattro settimane in 6 postazioni diverse, sia sopra vento che sotto vento, fino a circa 100m dall'impianto. I prelievi sono stati realizzati con campionatori attivi Microflow (Aquaria-MI) posizionati a circa 1,5m di altezza dal suolo e mediante piastre di area pari a 64cm² contenenti terreno di coltura, esposte a livello del suolo, con tempi di 10 minuti per la CBT a 20°C e a 37°C e 30 minuti per *Pseudomonas* spp., enterobatteri e clostridi solfito riduttori. I risultati ottenuti evidenziano come la contaminazione ambientale sia attribuibile principalmente a batteri psicrofili e micromiceti e permettono di individuare come punto critico per la diffusione dei microrganismi l'area in prossimità dell'impianto fino ad un massimo di 40m di distanza. Le cariche batteriche e fungine, infatti, presentavano un valore massimo nel punto di prelievo situato a 20m dall'impianto e diminuivano progressivamente fino a raggiungere, a 100m di distanza dall'impianto, valori molto vicini a quelli misurati sopra vento nella postazione di controllo. A 20m dall'impianto si rileva una contaminazione pari a 1227 CFU/m³ per i batteri mesofili, 4327 CFU/m³ per i batteri psicrofili, 4258 CFU/m³ per i miceti, 198 CFU/m³ per *Pseudomonas* spp. e 38 CFU/m³ per gli Enterobatteri. L'analisi aeromicrologica qualitativa ha permesso l'isolamento di 42 taxa fungini rappresentativi di 16 generi e 35 specie. I risultati hanno evidenziato la presenza di 6 taxa nell'aria della postazione di controllo e di 37, 31, 30, 27 e 26 taxa nei punti di campionamento posti a 20, 40, 60, 80 e 100m sotto vento rispetto all'impianto. A tal proposito, si sottolineano l'isolamento di 13 specie di *Aspergillus* e la costante presenza di *Alternaria alternata* e *Cladosporium* spp., funghi demaziacei responsabili di complesse manifestazioni allergiche fungine. La valutazione della contaminazione dell'aria misurata mediante l'esposizione delle piastre non è risultata sempre confrontabile con quella ottenuta utilizzando i campionatori attivi.

NEFROPATIA POST-TRAPIANTO RENALE E INFEZIONE DA POLYOMAVIRUS UMANO BK

A.Azzi, R.De Santis, P.Comoli¹, F.Ginevri²

Dip. di Sanità Pubblica (Sezione di Microbiologia e Virologia), Università di Firenze

¹ *Dip. di Pediatria, Sez. di Immunologia, Università di Pavia, IRCCS Policlinico San Matteo,* ² *Dip. di Nefrologia Pediatrica, Ist. G.Gaslini, Genova*

L'infezione da BKV può causare stenosi dell'uretere in trapiantati renali e cistite emorragica in pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo. Riattivazioni del virus, accompagnate da viruria asintomatica, si verificano con una certa frequenza anche in individui immunocompetenti. Studi recenti suggeriscono un ruolo di BKV nella patogenesi della nefrite interstiziale in trapiantati renali, una complicazione che può portare alla compromissione dell'organo trapiantato nel 45% dei pazienti colpiti. In base ad alcune osservazioni anche JCV potrebbe essere implicato nella stessa patologia. In entrambi i casi restano ancora molti aspetti da chiarire, quali l'incidenza della nefropatia post-trapianto associata a BKV e/o JCV, gli eventuali meccanismi patogenetici, le possibilità di diagnosi virologica e le possibilità terapeutiche. Attualmente, la diagnosi si basa sulla presenza di cellule con inclusioni virali (decoy cells) nel sedimento urinario e sulla dimostrazione della presenza del virus mediante immunoistochimica nel materiale biotico. A fine diagnostici è stata recentemente proposta anche la determinazione quantitativa della presenza del DNA virale nel plasma. Allo scopo di chiarire alcuni dei problemi citati, abbiamo condotto uno studio retrospettivo su 97 pazienti pediatrici sottoposti a trapianto renale negli ultimi 4 anni presso l'Istituto G. Gaslini. La ricerca del DNA virale mediante PCR sui campioni di siero e di urina ha mostrato che il 31 % dei pazienti presentava eliminazione urinaria di BKV e il 25 % di questi (5/30) presentava il DNA virale anche nel siero. Questi cinque bambini hanno presentato un aumento dei livelli di creatinina nel siero, i cui valori in 4 casi si sono stabilizzati con la riduzione della terapia immunosoppressiva, mentre nel quinto caso si è avuta la perdita del rene trapiantato. Quindici dei 30 pazienti con viruria da BKV presentavano anche viruria da JCV, ma JCV non è mai stato rinvenuto nel siero. Sequenze di DNA di JCV sono state rinvenute nelle urine di un solo paziente su 20 BKV-negativi. Verrà inoltre discusso il significato patogenetico e diagnostico della determinazione quantitativa del DNA virale nel siero e nelle urine e i risultati dell'analisi delle sequenze di alcuni isolati di BKV condotta al fine di rinvenire eventuali marcatori di patogenicità.

PERSISTENZA DEL GENOMA DI PARVOVIRUS UMANO B19 IN FIBROBLASTI CUTANEI DI PAZIENTI CON SCLEROSI SISTEMICA.

A. Azzi, K. Zakrzewska, A. Poggi, G.Abatangelo¹, C.Ferri²

Dip. di Sanità Pubblica (Sez. di Microbiologia e Virologia), Università di Firenze

¹ *Dip. di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova*

² *Dip. di Medicina Interna, Unità di Reumatologia, Università di Pisa*

Il parvovirus umano B19 può causare infezioni acute con rapida risoluzione ed eliminazione del virus. Si stanno tuttavia accumulando dimostrazioni della sua capacità di persistere non solo in pazienti notoriamente immunodepressi ma anche in soggetti apparentemente immunocompetenti. La persistenza del virus B19 può essere contraddistinta da viremia prolungata o ricorrente. In alcuni tessuti, quali il midollo osseo, il tessuto sinoviale e, recentemente, anche il fegato, è stata dimostrata la persistenza del genoma virale, in assenza di viremia. L'infezione da parvovirus B19 è spesso associata a manifestazioni cutanee, la più tipica delle quali è rappresentata dall'Eritema Infettivo. Anche la sclerosi sistemica (SSc), nel cui sviluppo è stato recentemente ipotizzato un coinvolgimento del virus B19, è caratterizzata molto frequentemente da lesioni cutanee. Nell'ambito di uno studio volto a stabilire l'eventuale associazione tra SSc e infezione da virus B19, abbiamo cercato il DNA virale in biopsie cutanee di pazienti con SSc e di volontari sani, come controllo. La presenza di DNA virale è stata dimostrata, mediante PCR, nelle biopsie cutanee del 53% dei pazienti e del 25% dei controlli, una differenza non statisticamente significativa. Per chiarire quali siano le cellule bersaglio dell'infezione a livello cutaneo, sono stati separati e coltivati *in vitro* fibroblasti e cheratinociti da biopsie cutanee ottenute da 8 pazienti con SSc. In quattro di questi il DNA virale è stato rinvenuto nel materiale biotico di partenza ed anche nelle colture di fibroblasti allestiti dagli stessi campioni. Il DNA di B19 è stato rinvenuto anche in subcolture successive degli stessi fibroblasti in concentrazioni non significativamente diverse rispetto a quella del primo passaggio. Le colture di cheratinociti sono invece risultate sempre negative. In conclusione, i fibroblasti cutanei sono bersaglio comune dell'infezione da parvovirus che sembra in grado di persistere in queste cellule. Alla luce della recente dimostrazione dell'attivazione di fibroblasti sinoviali infettati *in vitro* con parvovirus B19, si potrebbe ipotizzare che la persistenza dell'infezione nei fibroblasti cutanei giuochi un ruolo nella patogenesi della SSc, in presenza di condizioni predisponenti dell'ospite o di fattori ancora da identificare.

SEQUENZA DI DUE FORME ALLELICHE DEL GENE PER LA β -LATTAMASI CROMOSOMIALE DI *S. MARCESCENS*. EFFETTO DELLA LORO ESPRESSIONE SULLA SENSIBILITÀ AD ANTIBIOTICI β -LATTAMICI DI OSPITI TRASFORMATI.

Raimondi A., Sisto F., Rizzardi R., Pessina A., Ticozzi R. e Neri M.G.

Istituto di Microbiologia dell'Università degli Studi di Milano. Via Pascal 36 – 20 133 Milano.

Due mutanti di laboratorio di *S. marcescens*, entrambi produttori costitutivi di β -lattamasi, sono stati isolati da un ceppo inducibile di provenienza clinica. Entrambi risultavano meno sensibili ai β -lattamici rispetto al ceppo originale ma con marcate differenze tra loro. Il mutante **520R** mostrava MIC di Ceftazidime (CTZ) e Cefpirome (CPR) più alte (512 e 64 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente) di quelle del mutante **98R** (16 e 16 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente) ma, al contempo, le MIC di cefaloridina (CER) e piperacillina (PIP) erano 4-8 volte più basse per il primo mutante (256 e 64 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente) che per il secondo (1024 e 512 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente).

Ad un esame comparativo dei parametri cinetici della β -lattamasi purificata a partire dai tre ceppi era evidente che l'enzima del mutante 98R era del tutto uguale a quello del ceppo wt mentre l'enzima del mutante 520R mostrava, rispetto agli altri due, una efficienza catalitica molto aumentata nei confronti del CTZ (>1000 volte maggiore) ma diminuita nei confronti di cefaloridina e cefazolina (4 e 10 volte minore).

Il gene della β -lattamasi, sequenziato a partire dal ceppo wt e dal mutante 520R, risultava di 1137 bp, codificanti per 378 aa, dei quali 22 appartenenti alla sequenza segnale e 356 alla proteina matura. Le due forme alleliche differivano solo per una base. Nel mutante 520R una mutazione puntiforme aveva determinato una transizione da C a T nella posizione 257 e di riflesso un cambiamento nella posizione 64 della proteina matura, da treonina nel wt ad isoleucina nel 520R.

Cellule di *E. coli* DH5 α trasformate con il vettore di espressione pGZ119EH dopo clonaggio del gene nelle due forme alleliche mostravano diminuzione di sensibilità a tutti i composti β -lattamici saggiati ma, coerentemente con i dati di cinetica, l'espressione dell'enzima wt produceva una diminuzione di sensibilità più marcata nei confronti di CFZ, CER, PIP, mentre l'espressione dell'enzima 520R provocava una diminuzione di sensibilità più marcata nei confronti di CTZ, cefixime e ceftriaxone.

SOPPRESSIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA LMP1 DEL VIRUS DI EPSTEIN BARR MEDIANTE OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO

Silvia Masciarelli*, Roberta Galletti*, Cinzia Conti*, Paola Samoggia[§], Stefania Meschini[^] e Elena Mattia*

*Dip. di Scienze di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza", [§]Dip. Di Ematologia e Oncologia, [^]Dip. Di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

E' generalmente accettato che l'espressione dei geni latenti EBNA-2, EBNA-3A, -3C, EBNA-LP e LMP1 del virus di Epstein Barr (EBV) è essenziale per la trasformazione e la immortalizzazione dei linfociti B. Tra questi, LMP1 gioca un ruolo chiave nel favorire la sopravvivenza e la disseminazione delle cellule B infettate mediante la induzione di geni anti-apoptotici e modificazioni fenotipiche di antigeni superficiali e molecole di adesione. Abbiamo precedentemente dimostrato che oligonucleotidi antisenso diretti al mRNA di LMP1, sono in grado di sopprimerne efficacemente la traduzione e di ridurre considerevolmente la proliferazione di linfociti B trasformati. Nell'ambito di questa ricerca abbiamo usato oligomeri LMP1-antisenso per valutare se la soppressione del gene LMP1, influenzi l'espressione di altri geni di EBV con potenziale oncogenico espressi durante la latenza, di geni cellulari anti-apoptotici o alterare il fenotipo delle cellule B trasformate. I risultati ottenuti indicano che la soppressione di LMP1 non modula l'espressione di EBNA-2, EBNA-3A, -3B e -3C, ne' quella dei geni antiapoptotici bcl-2 e mcl-1. Al contrario, il trattamento delle cellule B95.8 con l'antisenso-LMP1, induce modificazioni significative nel pattern di espressione di molecole di attivazione e markers di superficie, caratteristici dei linfociti B trasformati dal virus.

Nell'ottica di una possibile utilizzazione di oligonucleotidi antisenso-LMP1 come agenti terapeutici nei tumori associati alla presenza di EBV, sono in corso studi mirati ad incrementare la concentrazione intracellulare degli oligomeri antisenso LMP1, mediante l'uso di sistemi di veicolaggio diversi.

ANALISI MOLECOLARE DEL GENE *penA* ASSOCIATO ALLA DIMINUITA SENSIBILITA' ALLA PENICILLINA IN CEPPI DI MENINGOCOCCO

P. Stefanelli¹, C. Fazio¹, M. Muscillo², e P. Mastrantonio¹

¹Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, ²Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità', Roma.

Dal 1994 al 2000 sono stati inviati 374 ceppi di *Neisseria meningitidis* al Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'Istituto Superiore di Sanità, con funzione di Laboratorio di Riferimento Nazionale all'interno del Programma di Sorveglianza delle Meningiti Batteriche in Italia.

L'analisi della sensibilità verso gli agenti chemioterapici di questi ceppi, ha permesso di individuare circa un 25% di meningococchi a diminuita sensibilità verso la penicillina. Alterazioni delle PBP di classe 2 codificate dal gene *penA* sembra essere il meccanismo più diffuso per la diminuita affinità con l'antibiotico. In ceppi di meningococco, non beta-lattamasi produttori, la presenza di traslocazioni in parte del gene *penA* con frammenti di DNA dello stesso gene provenienti da altre specie di *Neisseriae* non patogene frequentemente colonizzanti il nasofaringe può essere responsabile di una diminuita sensibilità dei ceppi verso la penicillina.

In questo studio l'analisi di sequenza realizzata sul gene *penA* di 28 ceppi di *N. meningitidis* isolati da casi di meningite, 24 con diminuita sensibilità (fenotipo pen¹) e 4 sensibili alla penicillina (fenotipo pen^S) utilizzati come controllo, ha permesso di individuare la presenza di una o più traslocazioni. In particolare in un ceppo pen¹ è stata individuata la presenza di una traslocazione dal gene *penA* di *N. flavescens*; in 11 ceppi pen¹ sono state individuate traslocazioni da *N. cinerea* e/o *N. perflava/sicca* quest'ultima mai descritta precedentemente; in 1 ceppo pen¹ è stata identificata una duplicazione di 54 nucleotidi all'estremità 3' del gene *penA*; mentre per 11 ceppi pen¹ non sono state individuate alcun tipo di alterazioni. Per quest'ultimi altri meccanismi responsabili di una diminuita sensibilità alla penicillina dovranno essere indagati. L'analisi del polimorfismo del gene *penA* potrebbe non essere sufficiente a caratterizzare tutti i ceppi di meningococco con fenotipo pen¹.